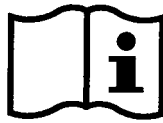


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Instruction for use

AMA-M2 ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of IgG autoantibodies against mitochondrial M2 subtype antigen (AMA-M2) in human serum or plasma



DE7000



96 Tests

PRINCIPLE OF THE TEST

Highly purified mitochondrial M2 subtype (PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2) antigen is bound to microwells. Antibodies against the coated antigen, if present in diluted patient sample, bind to the respective antigen. Washing of the microwells removes unbound unspecific serum and plasma components. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human antibodies immunologically detect the bound patient antibodies forming a conjugate/antibody/antigen complex. Washing of the microwells removes unbound conjugate. An enzyme substrate in the presence of bound conjugate hydrolyzes to form a blue colour. The addition of an acid stops the reaction forming a yellow end-product. The intensity of this yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The amount of colour is directly proportional to the concentration of antibodies present in the original sample.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Anti-mitochondrial antibodies (AMA) are a heterogeneous group of autoantibodies directed against various proteins that are located in the outer and inner membrane of mitochondria. Specific anti-mitochondrial antibodies have been described for the primary biliary cirrhosis (PBC) as subtypes M2, M4, M8 and M9. Other AMA subtypes are related to other diseases, like collagenosis (AMA-M5) and drug induced LE and Hepatitis (AMA-M3 and AMA-M6).

The heterogeneously reacting specific anti-mitochondrial antibodies of the M2 subtype are directed against three related proteins of the alpha-keto acid dehydrogenase complex which is located at the inside of the mitochondrial membrane. The recognized major epitope is located on the E2 subunit and the protein X of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC). Additionally AMA-M2 autoantibodies recognize the (E1a und E1b) subunits of the same complex and the E2 subunit of several other multi enzyme complexes, such as the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC) and the branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC).

Using HEp2 Cell monolayers for indirect immune fluorescence AMA-M2 autoantibodies are characterized as a fine-speckled cytoplasmic, perinuclear condensed fluorescence pattern. For differential diagnosis of the primary biliary cirrhosis (PBC) determination of AMA-M2 by ELISA is recommended because of its high sensitivity and specificity.

In patients with other autoimmune diseases determination of AMA antibodies allows an early screening for the occurrence of subtype M2 and M9 antibodies which may be related with the development and / or association of PBC.

Profiling the AMA subtypes allows an immunological and prognostic classification of the primary biliary cirrhosis. Beginning cases of symptomatic PBC often exhibit only AMA-M2 subtype antibodies (sometimes in combination with AMA-M9), whereas progressive cases and mixed syndromes with chronic acute hepatitis (CAH) are related with the occurrence of AMA-M2, -M4 and -M8 antibody subtypes.

CONTENTS OF THE KIT

Sufficient for 96 determinations

1 One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.

6x 1.5 ml Calibrator A-F (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 IU/ml), containing serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use.

2x 1.5 ml Control positive (1) and negative (2), containing AMA-M2 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.

20 ml Sample Buffer P, containing PBS, BSA, detergent, preservative NaN₃ 0.09%, yellow, 5 x conc.

15 ml Enzyme Conjugate containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%, light red. Ready to use.

15 ml TMB Substrate; containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin, colorless. Ready to use.

15 ml Stop Solution; contains acid. Ready to use.

20 ml Wash Solution, containing Tris, detergent, preservative NaN₃ 0.09%; 50 x conc.

1 Instruction for Use

1 Certificate of Analysis

MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8 °C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Solution and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8 °C. We recommend consumption on the same day.

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28 °C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of Wash Solution.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
 - Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
 - Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
 - Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
 - Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
 - Controls, Calibrators, Sample Buffer and Wash Solution contain sodium azide (NaN₃) 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
 - Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
 - During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:
 - First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
 - Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
 - Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
 - Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitrile rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
 - Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
 - For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

PREPARATION OF REAGENTS

Wash Solution

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50 x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

Sample Buffer

Sample Buffer P: Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well.

Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette 100 µl of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µl of wash solution.
4. Dispense 100 µl of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for 15 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µl of wash solution.
7. Dispense 100 µl of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature
9. Add 100 µl of stop solution to each well of the modules
10. Incubate for 5 minutes at room temperature.
11. Read the optical density at 450 nm (reference 600-690 nm) and calculate the results. The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1, ... patient sample A-F calibrators C+, C- controls

VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit. If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Calibration**

The assay system is calibrated against the international reference preparation WHO 67/183 for AMA-M2 as 100 IU/ml.

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 200 IU/ml

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay: Cut-off 10 IU/ml

Interpretation of results

Negative: < 10 IU/ml
Positive: ≥ 10 IU/ml

Linearity

Samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed IU/ml	Expected IU/ml	O/E [%]
WHO	1:100	108.5	100.0	109
.	1:200	51.2	50.0	102
.	1:400	25.2	25.0	101
.	1:800	12.8	12.5	102
.	1:1600	6.1	6.3	98
.	1:3200	3.1	3.1	99
1	1:100	49.5	49.5	100
.	1:200	25.0	24.8	101
.	1:400	12.2	12.4	99
.	1:800	5.9	6.2	95

Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 1 IU/ml

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean IU/ml	CV %
1	39.8	7.0
2	81.3	3.8
3	177.3	3.6

Inter-Assay		
Sample	Mean IU/ml	CV %
1	40.1	6.2
2	84.6	11.8
3	180.4	3.8

Study results

Study population	n	n Pos	%
Primary biliary cirrhosis (PBC)	143	139	97.2
Rheumatoid Arthritis	60	1	1.7
Normal human sera	267	18	6.7

Clinical Diagnosis

	Pos	Neg	
Pos	139	19	
Neg	4	308	
	143	327	470

Sensitivity: 97.2 %
 Specificity: 94.2 %
 Overall agreement: 95.1 %

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE




This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.











The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

REFERENCES

1. Berg, P.A. and Klein, R. Diagnose der primär-biliären Zirrhose. IVD Nachrichten 1990; 1/1: 6 -7.
2. Berg, P.A. and Klein, R. Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies. Sem. Liver Dis. 1989; 9: 103 - 116.
3. Berg, P.A. and Klein, R. Immunology of primary biliary cirrhosis. Ballière's Clin.Gastroenterol. 1987; 1: 675 - 706.
4. Baum, H. and Palmer, C. The PBC specific antigen. Mol. Aspects Med. 1985; 8: 201 - 234.
5. Fussey, S.P.M., Guest, J.R., James, O.F W. et al. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. PNAS, USA 1988; 85: 8654 - 8658.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
				
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
Distributed by				
Content	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
Volume/No.	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Instruction for use

ANA Hep Screen ELISA

Enzyme Immunoassay for Qualitative Screening for IgG Autoantibodies to Nuclear Antigens in human serum or plasma



DE7020



96 Tests

PRINCIPLE OF THE TEST

A mixture of purified antigens SS-A-52 (Ro-52), SS-A-60 (Ro-60), SS-B (La), RNP/Sm, RNP-70, RNP-A, RNP-C, Sm-BB, Sm-D, Sm-E, Sm-F, Sm-G, Scl-70, Jo-1, dsDNA, ssDNA, polynucleosomes, mononucleosomes, histone complex, histone H1, histone H2A, histone H2B, histone 3, histone H4, Pm-Scl-100 and centromere B is coated on to microwells. Antibodies against the coated antigen, if present in diluted patient sample, bind to the respective antigen. Washing of the microwells removes unbound unspecific serum and plasma components. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human antibodies immunologically detect the bound patient antibodies forming a conjugate/antibody/antigen complex. Washing of the microwells removes unbound conjugate. An enzyme substrate in the presence of bound conjugate hydrolyzes to form a blue colour. The addition of an acid stops the reaction forming a yellow end-product. The intensity of this yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The amount of colour is directly proportional to the concentration of antibodies present in the original sample.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Connective tissue diseases (CTD) are a group of autoimmune disorders which are characterized by presence of antinuclear antibodies (ANA) in the blood of patients. ANA are a specific class of autoantibodies that have the capability of binding and destroying certain structures within the nucleus of the cells. These antibodies are involved in the disease pathogenesis, and they also constitute the basis for diagnosis and treatment of CTD. ANA have been categorized into two main groups:

1. Autoantibodies to DNA and histones

2. Autoantibodies to extractable nuclear antigens (ENA):

Sm, ribonucleoproteins (RNP), SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 and PM1

Autoantibodies to DNA and histones include antibodies against single and double stranded DNA (ssDNA and dsDNA). Significant levels of anti-dsDNA antibodies are considered to be confirmatory in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). Anti-histone antibodies are indicative of drug-induced lupus. Besides DNA and histones, autoantibodies may also target other nuclear antigens. These nuclear antigens were named extractable nuclear antigens (ENA), as originally they were extracted from the nuclei with saline solution. Autoantibodies to Smith antigen (Sm) which is also considered to be highly specific for SLE were the first anti-ENA detected. Thereafter, further subtypes of ENA i.e. ribonucleoproteins (RNP), Sjögren antigen A or B (SSA/Ro or SSB/La), Scl-70, Jo-1 and PM1 were identified. Although most of these ENA are disease specific, a significant overlap exists. Sensitivity and specificity may also vary depending upon the type of underlying CTD. Presence of autoantibodies in the sera of patients constitutes one of the criteria used for diagnosis of CTD. Together with the clinical diagnosis ANA subtyping helps in identifying a specific CTD. Indirect immunofluorescence tests (IF) and enzyme immunoassays (ELISA) are commonly used for ANA detection in day to day practice. Initially, screening is carried out by IF-ANA or a generic ELISA which detects ANA of a broad specificity similar to IF-ANA. If positive, more specific tests are performed based on clinical findings and the IF-ANA staining pattern. These antigen specific ELISA assays react with single autoantigens e.g. dsDNA, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, Sm, Sm/RNP etc. Autoantibodies to dsDNA are specific and diagnostic for SLE and levels are elevated during active disease. Recently published ACR Guidelines for Screening, Treatment, and Management of Lupus Nephritis recommend the testing of antibodies to dsDNA for monitoring of lupus nephritis, ranging from monthly intervals in pregnant patients with active glomerulonephritis at onset of treatment to every three months in patients with active nephritis at onset of treatment or pregnant patients with previous but not current nephritis, up to six-monthly testing in patients with previous active nephritis or no prior or current nephritis. SLE-Patients without antibodies against dsDNA often produce antibodies against ssDNA. Similarly anti-Sm is highly specific for SLE but is present in only 10 % to 30 % of SLE cases. Antibodies against dsDNA, histones, the 70 kD protein of the U1-snRNP complex (RNP70) and anti Sm are closely associated with SLE. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies are indicative for Sjögren's syndrome, but can also be found in up to 30 % cases of SLE with cutaneous involvement. Anti-SSA/Ro antibodies pass the placenta and may cause the development of SLE in neonates. Anti-SSA/Ro antibodies are almost always present in sera of mothers with babies with neonatal lupus syndrome and with complete congenital heart block. Antinucleolar antibodies are a group of autoantibodies which give a nucleolar IF-staining pattern. Most common of these are anti-PM-Scl, anti-RNA polymerase I-III and anti-U3-RNP. They are found in scleroderma and polymyositis (PM). Antibodies against RNP and the complex RNP/Sm are linked to mixed connective tissue disease (MCTD, Sharp syndrome) and to SLE.

Serologically MCTD is characterized by the presence of autoantibodies directed against the 70 kD protein of the U1-snRNP-complex. Up to 100% of MCTD patients manifest high titers of Anti-RNP-70 antibodies.

Autoantibody prevalence to (values in %)

Diseases	ds DNA	ss DNA	His tone	SS-A	SS-B	Sm	RNP/ Sm	Sci-70	Jo-1
Systemic lupus erythematosus (SLE)	> 90	> 90	30-50	10-30	30-50	10-30	10-30		
Drug-induced lupus (DIL)		30-50	50-90						
Sharp-syndrome / mixed connective tissue disease	10-30	10-30					> 90		
Rheumatoid arthritis	10-30	30-50	30-50	10-30					
Sjögren´s syndrome	10-30	10-30		> 90	> 90				
Scleroderma	10-30	10-30		10-30				> 90	
Photosensitive dermatitis, dermatomyositis	10-30	10-30							50-90

CONTENTS OF THE KIT

Sufficient for 96 determinations

1 One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.

1x 1.5 ml Control A (negative), containing ANA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use.

1x 1.5 ml Control B (cut-off), containing ANA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use.

1x 1.5 ml Control C (positive), containing ANA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use.

20 ml Sample Buffer P, containing PBS, BSA, detergent, preservative NaN₃ 0.09%, yellow, 5 x conc.

15 ml Enzyme Conjugate containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%, light red. Ready to use.

15 ml TMB Substrate; containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin, colorless. Ready to use.

15 ml Stop Solution; contains acid. Ready to use.

20 ml Wash Solution, containing Tris, detergent, preservative NaN₃ 0.09%; 50 x conc.

1 Instruction for Use

1 Certificate of Analysis

MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8 °C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Solution and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8 °C. We recommend consumption on the same day.

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28 °C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of Wash Solution.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
 - Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
 - Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
 - Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
 - Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
 - Controls, Calibrators, Sample Buffer and Wash Solution contain sodium azide (NaN₃) 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
 - Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
 - During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:
 - First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
 - Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
 - Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
 - Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
 - Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
 - For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

PREPARATION OF REAGENTS

Wash Solution

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

Sample Buffer

Sample Buffer P: Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well. Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette **100 µl** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for **30 minutes** at room temperature (20-28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
4. Dispense **100 µl** of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times** with **300 µl** of wash solution.
7. Dispense **100 µl** of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **15 minutes** at room temperature
9. **Add 100 µl** of stop solution to each well of the modules
10. Incubate for **5 minutes** at room temperature.
11. Read the optical density at 450 nm (reference 600-690nm) and calculate the results. The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A											
B	B											
C	C											
D	P1											
E	P2											
F	P3											
G												
H												

P1, ... patient sample A-C controls

VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit. If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

CALCULATION OF RESULTS

For qualitative results the optical density (OD) of a sample is compared to the optical density of Control B:

Negative: OD sample < OD Control B
 Positive: OD sample ≥ OD Control B

For detailed results the optical density of a sample is expressed as Index value:

Index = OD sample / OD Control B

PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Calibration**

The assay system is calibrated against the internationally recognised reference sera from CDC, Atlanta, USA and furthermore against the reference preparation WHO Wo/80 for human anti-dsDNA.

Measuring range

not applicable

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay: Cut-off Index 1.0

Interpretation of results

Negative: Index < 1.0
 Borderline: Index 1.0 - 1.2
 Positive: Index > 1.2

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer. Activity for each dilution step was calculated as Index- Value.

Sample	Dilution	Observed Index	Expected Index	O/E [%]
1	1:100	4.8	4.8	100
.	1:200	2.2	2.4	92
.	1:400	1.3	1.2	108
.	1:800	0.6	0.6	100
2	1:100	2.8	2.8	100
.	1:200	1.5	1.4	107
.	1:400	0.8	0.7	114
.	1:800	0.4	0.4	111
3	1:100	3.5	3.5	100
.	1:200	1.7	1.8	94
.	1:400	0.8	0.9	89
.	1:800	0.5	0.5	96

Limit of detection

not applicable

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparine). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean Index	CV %
1	1.8	6.9
2	2.4	9.1
3	2.8	10.4

Inter-Assay		
Sample	Mean Index	CV %
1	1.6	9.9
2	3.7	10.4
3	4.1	11.2

Study results

Study population	n	n Pos	%
SLE	63	62	98.4
Sjorgen's Syndrome	2	2	100.0
MCTD	9	9	100.0
Poly-Dermatomyositis	8	8	100.0
Scleroderma	3	3	100.0
CREST	9	9	100.0
Normal human sera	148	3	2.0

Clinical Diagnosis

	Pos	Neg	
Pos	93	3	
Neg	1	145	
	94	148	242

Sensitivity: 98.9 %

Specificity: 98.0 %

Overall agreement: 98.3 %

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE










This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.











The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

REFERENCES

1. Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(6):556-560.
2. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus* 2010; 19(8):906-912.
3. Brouwer R, Hengstman GJ, Vree EW, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(2):116-123.
4. Castro C, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S238-S247.
5. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G et al. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2011; 10(3):150-154.
6. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of Systemic Lupus Erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13(1):R30.
7. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis JID - 0372355* 2004; 63(4):386-394.
8. Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011; 20(3):250-255.
9. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(7):1052-1056.
10. Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Rev* 2010; 233(1):126-145.
11. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4:1.
12. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420-1422.
13. Petri M, Magder L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus* 2004; 13(11):829-837.
14. Poole BD, Schneider RI, Guthridge JM, Velte CA, Reichlin M, Harley JB et al. Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):848-859.
15. Putova I, Dostal C, Becvar R. Prevalence of antinucleosome antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109:275-286.
16. Reveille JD. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus JID - 9204265* 2004; 13(5):290-297.
17. Simon JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(2):220-224.
18. Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab* 2007; 53(3-4):183-191.
19. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(2):316-324.
20. Maidhof W., Hiliias O. Lupus: an overview of the disease and management options. *P T* 2012; 37(4):240-9.
21. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64(6):797-808.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
				
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
Distributed by				
Content	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
Volume/No.	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Borrelia burgdorferi IgG ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi* in serum and plasma



DEBOR01



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS.....	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION.....	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS.....	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11. LITERATUR.....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Borrelia burgdorferi IgG antibody ELISA kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgG antibodies against Borrelia burgdorferi in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Borrelia burgdorferi belongs to the family of spirochetes, of which three types have been identified to be human pathogenic: Borrelia burgdorferi sensu stricto, B. afzelii and B. garinii. The endemic areas of Borrelia are in Central and Eastern Europe, as well as Russia, China and Japan. The illness is transferred via tick bites, in Europe mainly by Ixodes ricinus. In the endemic zones, like Southern Germany and Austria, up to 50 % of the ticks are infected.

In the clinical course, after an erythema migrans, e.g. with neuroborreliosis, which appears at the first stage, also chronic arthritis, encephalitis, meningitis, myositis and hepatitis are observed. Treatment is done via different antibiotics, e.g. doxycyclin, amoxicillin, cefuroxim and penicillin G. A specific immunization is possible with immunoprophylaxis either by a recombinant OspA or by a recombinant polyvalent OspC vaccine.

The laboratory diagnosis is performed by the detection of antibodies in blood and cerebrospinal fluid. Methods employed are: ELISA, immunofluorescence, hemagglutination or Western blot. Besides whole cell extracts, recently there are increasingly used purified or recombinant single proteins as antigens. This brings however generally a decrease in sensitivity. It could be shown that between the various test methods there appear significant differences in the interpretation, so that the most reliable method seems to be the follow-up of the titer development. Western blot serves as a confirmatory test, because electrophoretically separated single antigens can be evaluated in their reaction with specific serum antibodies.

The Borrelia burgdorferi IgG ELISA test kit contains besides a whole cell antigen extract of Borrelia burgdorferi sensu stricto, which cross-reacts with Borrelia afzelii and Borrelia garinii, an addition of pure OspC, which increases the specificity and sensitivity of the assay. If the test shows only a positive IgG result (IgM negative), the immunity of the patient can be concluded. As mentioned above, in the case of a clearly positive clinical finding, there should be performed a confirmation of the titer increase with the same assay. With a positive IgM (DEMEDITEC Borrelia burgdorferi ELISA DEBOR03) at the same time, there is a strong suspicion of an active disease.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Borrelia burgdorferi IgG antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Borrelia burgdorferi antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgG antibodies of the serum and the immobilized Borrelia burgdorferi antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgG peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of IgG antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Components	Volume / Qty.
Borrelia burgdorferi antigen coated microtiter strips	12
Calibrator A (Negative Control)	2 mL
Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
Calibrator D (Positive Control)	2 mL
Enzyme Conjugate	15 mL
Substrate	15 mL
Stop Solution	15 mL
Sample Diluent	60 mL
Washing Buffer (10×)	60 mL
Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Mikrotiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Borrelia antigen (mix of Borrelia sensu stricto, Borrelia afzelii und Borrelia garinii). Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgG antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgG antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgG antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgG antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgG-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L ProclinTM. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8 °C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20 °C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8 °C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.020	
Negative Control	0.032	0.012
Cut-Off Standard	0.522	0.502
Weak Positive Control	0.815	0.795
Positive Control	1.699	1.679

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Borrelia IgG antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Borrelia burgdorferi ELISA	IgG
Intra-Assay-Precision	4.8 %
Inter-Assay- Precision	7.7 %
Inter-Lot- Precision	2.8 – 10.6 %
Analytical Sensitivity	0.99 U/mL
Recovery	79 – 88 %
Linearity	77 – 126 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to TBEV (FSME)
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL.
Clinical Specificity	97 %
Clinical Sensitivity	88 %

11. REFERENCES

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *J Clin Microbiol*, 1992, 30:370-376
2. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers, *Zbl Bakt Hyg A*, 1986, 263: 412-419
3. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, *J Infect Dis*, 1993; 167:392-400
4. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, *J of Clin Immunoassay*, 1993; 16:208-214
5. Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* species, *Microbiol Rev*, 1986, 50:381-400
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp.nov.* and group VS461 associated with Lyme borreliosis, *Int J Syst Bacteriol* 1992, 42:378-383
7. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgM antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, *J Infect Dis*, 1988, 158:754-760
8. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, *Med Microbiol Immunol*, 1994, 182:255-270
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains, *Zbl Bakt Hyg A*, 1986, 263:92-102
10. Steere AC: Lyme Disease, *New Engl J Med*; 1989, 321:586-597
11. Grodzicki RL, Steere AC: Comparison of Immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease, *J Infect Dis*, 1988, 157:790-797
12. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC: Cross-reactivity in serological tests for Lyme Disease and other spirochetal infections, *J Infect Dis*, 1987, 156:183-186

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Borrelia burgdorferi IgG ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgG-Antikörpern gegen Borrelia im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Borrelia burgdorferi zählt zu der Familie der Spirochäten, wobei drei Arten als humanpathogen deklariert werden: B. burgdorferi sensu stricto, B. afzelii und B. garinii. Endemiegebiete liegen in Zentral- und Osteuropa sowie Russland, China und Japan. Die Krankheit wird durch Zeckenbisse, und zwar in Europa vor allem durch Ixodes ricinus übertragen. In den Endemiegebieten wie Süddeutschland und Österreich sind bis zu 50 % der Zecken infiziert. Im klinischen Verlauf zeigt sich nach einem im ersten Stadium auftretenden Erythema migrans z.B. eine Neuroborreliose, aber auch chronische Arthritis, Enzephalitis, Meningitis, Myositis und Hepatitis wurden beobachtet. Die Labordiagnostik erfolgt über den Nachweis von Antikörpern in Blut und Liquor. Als Methoden werden ELISA, Immunfluoreszenz-, Hämagglutination oder Western-Blot eingesetzt. Neben Ganzzellextrakten wurden in letzter Zeit zunehmend aufgereinigte oder rekombinante Einzelproteine als Antigene eingesetzt. Hierbei muss allerdings in der Regel auf Sensitivität verzichtet werden. Es hat sich gezeigt, dass zwischen den verschiedenen Test-Methoden erhebliche Unterschiede in der Interpretation auftreten, so dass ein sicheres Verfahren in der Beobachtung des Titerverlaufs besteht. Der Western-Blot dient als Bestätigungstest, da elektrophoretisch aufgetrennte Einzelantigene in ihrer Reaktion mit spezifischen Serumantikörpern ausgewertet werden können. Die Borrelia burgdorferi IgG- und IgM-ELISA-Kits enthalten neben einem mit B. afzelii und B. garinii kreuzreagierenden Ganzzell-Antigenextrakt von Borrelia burgdorferi sensu stricto einen Anteil von reinem OspC von B. afzelii, wodurch die Sensitivität und die Spezifität der Tests erhöht werden. Liegt lediglich ein positives IgG-Ergebnis (IgM negativ) vor, kann man von einer Immunität des Probanden ausgehen. Wie oben erwähnt, sollte allerdings bei eindeutig klinischem Befund eine Überprüfung des Titeranstiegs mit dem gleichen Assay durchgeführt werden. Bei gleichzeitig positivem IgM-Befund (DEMEDITEC Borrelia burgdorferi ELISA DEBOR03) ergibt sich ein Hinweis auf ein aktives Geschehen.

3. TESTPRINZIP

Der Borrelia IgG Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Borrelia burgdorferi-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgG-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Borrelia-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgG-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgG-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Komponenten	Volumen / Menge
Borrelia-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
Anti-human-IgG-Enzymkonjugat	15 mL
Substratlösung	15 mL
Stopp-Lösung	15 mL
Probenverdünner	60 mL
Waschpuffer (10x)	60 mL
Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Borrelia-Antigen (Mischung von Borrelia sensu stricto, Borrelia afzelii und Borrelia garinii). Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgG-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgG-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N acidic solution. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,020	
Negativ-Kontrolle	0,032	0,012
Cut-Off Standard	0,522	0,502
schwach Positiv-Kontrolle	0,815	0,795
Positiv-Kontrolle	1,699	1,679

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden.

Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Borrelia IgG Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Borrelia burgdorferi ELISA	IgG
Intra-Assay-Präzision	4,8 %
Inter-Assay-Präzision	7,7 %
Inter-Lot-Präzision	2,8 – 10,6 %
Analytische Sensitivität	0,99 U/mL
Wiederfindung	79 – 88 %
Linearität	77 – 126 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen FSME
Interferenzen	Keine Interferenzen mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	97 %
Klinische Sensitivität	88 %

11. LITERATUR

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against Borrelia burgdorferi, J Clin Microbiol, 1992, 30:370-376
2. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against Borrelia burgdorferi in Bavarian forest workers, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263: 412-419
3. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, J Infect Dis, 1993; 167:392-400
4. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 1993; 16:208-214
5. Barbour AG, Hayes SF: Biology of Borrelia species, Microbiol Rev, 1986, 50:381-400
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis, Int J Syst Bacteriol 1992, 42:378-383
7. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgM antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, J Infect Dis, 1988, 158:754-760
8. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, Med Microbiol Immunol, 1994, 182:255-270
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European Borrelia burgdorferi strains, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263:92-102
10. Steere AC: Lyme Disease, New Engl J Med; 1989, 321:586-597

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Borrelia burgdorferi IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi* in serum and plasma



DEBOR03



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS.....	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION.....	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG.....	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS.....	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11. LITERATUR.....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Borrelia burgdorferi IgM antibody ELISA kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgM antibodies against Borrelia burgdorferi in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Borrelia burgdorferi belongs to the family of spirochetes, of which three types have been identified to be human pathogenic: Borrelia burgdorferi sensu stricto, B. afzelii and B. garinii. The endemic areas of Borrelia are in Central and Eastern Europe, as well as Russia, China and Japan. The illness is transferred via tick bites, in Europe mainly by Ixodes ricinus. In the endemic zones, like Southern Germany and Austria, up to 50 % of the ticks are infected.

In the clinical course, after an erythema migrans, e.g. with neuroborreliosis, which appears at the first stage, also chronic arthritis, encephalitis, meningitis, myositis and hepatitis are observed. Treatment is done via different antibiotics, e.g. doxycyclin, amoxicillin, cefuroxim and penicillin G. A specific immunization is possible with immunoprophylaxis either by a recombinant OspA or by a recombinant polyvalent OspC vaccine.

The laboratory diagnosis is performed by the detection of antibodies in blood and cerebrospinal fluid. Methods employed are: ELISA, immunofluorescence, hemagglutination or Western blot. Besides whole cell extracts, recently there are increasingly used purified or recombinant single proteins as antigens. This brings however generally a decrease in sensitivity. It could be shown that between the various test methods there appear significant differences in the interpretation, so that the most reliable method seems to be the follow-up of the titer development. Western blot serves as a confirmatory test, because electrophoretically separated single antigens can be evaluated in their reaction with specific serum antibodies.

The Borrelia burgdorferi IgM ELISA test kit contains besides a whole cell antigen extract of Borrelia burgdorferi sensu stricto, which cross-reacts with Borrelia afzelii and Borrelia garinii, an addition of pure OspC, which increases the specificity and sensitivity of the assay. If the test shows only a positive IgG result (IgM negative), the immunity of the patient can be concluded. As mentioned above, in the case of a clearly positive clinical finding, there should be performed a confirmation of the titer increase with the same assay. With a positive IgM at the same time, there is a strong suspicion of an active disease.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Borrelia burgdorferi IgM antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Borrelia burgdorferi antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgM antibodies of the serum and the immobilized Borrelia burgdorferi antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgM peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of IgM antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Components	Volume / Qty.
Borrelia burgdorferi antigen coated microtiter strips	12
Calibrator A (Negative Control)	2 mL
Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
Calibrator D (Positive Control)	2 mL
Enzyme Conjugate	15 mL
Substrate	15 mL
Stop Solution	15 mL
Sample Diluent	60 mL
Washing Buffer (10×)	60 mL
Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Mikrotiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Borrelia burgdorferi antigen (mix of Borrelia sensu stricto, Borrelia afzelii und Borrelia garinii). Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgM-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L ProclinTM. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8 °C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20 °C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8 °C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.021	
Negative Control	0.023	0.002
Cut-Off Standard	0.620	0.599
Weak Positive Control	1.002	0.981
Positive Control	2.421	2.400

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Borrelia IgM antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

For doubtful IgM positive results and for the confirmation of positive reactions the absorption of Rheumatoid Factor should be conducted with an appropriate reagent (Cat. No. DEMJS02, RF-Adsorbent).

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Borrelia burgdorferi ELISA	IgM
Intra-Assay-Precision	5.0 %
Inter-Assay- Precision	9.0 %
Inter-Lot- Precision	4.8 – 10.3 %
Analytical Sensitivity	0.99 U/mL
Recovery	110 – 111 %
Linearity	77 – 120 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to TBEV (FSME)
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL.
Clinical Specificity	100 %
Clinical Sensitivity	100 %

11. REFERENCES

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *J Clin Microbiol*, 1992, 30:370-376
2. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers, *Zbl Bakt Hyg A*, 1986, 263: 412-419
3. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, *J Infect Dis*, 1993; 167:392-400
4. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, *J of Clin Immunoassay*, 1993; 16:208-214
5. Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* species, *Microbiol Rev*, 1986, 50:381-400
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp.nov.* and group VS461 associated with Lyme borreliosis, *Int J Syst Bacteriol* 1992, 42:378-383
7. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgM antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, *J Infect Dis*, 1988, 158:754-760
8. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, *Med Microbiol Immunol*, 1994, 182:255-270
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains, *Zbl Bakt Hyg A*, 1986, 263:92-102
10. Steere AC: Lyme Disease, *New Engl J Med*; 1989, 321:586-597
11. Grodzicki RL, Steere AC: Comparison of Immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease, *J Infect Dis*, 1988, 157:790-797
12. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC: Cross-reactivity in serological tests for Lyme Disease and other spirochetal infections, *J Infect Dis*, 1987, 156:183-186

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Borrelia burgdorferi IgM ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgM-Antikörpern gegen Borrelia im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Borrelia burgdorferi zählt zu der Familie der Spirochäten, wobei drei Arten als humanpathogen deklariert werden: B. burgdorferi sensu stricto, B. afzelii und B. garinii. Endemiegebiete liegen in Zentral- und Osteuropa sowie Russland, China und Japan. Die Krankheit wird durch Zeckenbisse, und zwar in Europa vor allem durch Ixodes ricinus übertragen. In den Endemiegebieten wie Süddeutschland und Österreich sind bis zu 50 % der Zecken infiziert. Im klinischen Verlauf zeigt sich nach einem im ersten Stadium auftretenden Erythema migrans z.B. eine Neuroborreliose, aber auch chronische Arthritis, Enzephalitis, Meningitis, Myositis und Hepatitis wurden beobachtet. Die Labordiagnostik erfolgt über den Nachweis von Antikörpern in Blut und Liquor. Als Methoden werden ELISA, Immunfluoreszenz-, Hämagglutination oder Western-Blot eingesetzt. Neben Ganzzellextrakten wurden in letzter Zeit zunehmend aufgereinigte oder rekombinante Einzelproteine als Antigene eingesetzt. Hierbei muss allerdings in der Regel auf Sensitivität verzichtet werden. Es hat sich gezeigt, dass zwischen den verschiedenen Test-Methoden erhebliche Unterschiede in der Interpretation auftreten, so dass ein sicheres Verfahren in der Beobachtung des Titerverlaufs besteht. Der Western-Blot dient als Bestätigungstest, da elektrophoretisch aufgetrennte Einzelantigene in ihrer Reaktion mit spezifischen Serumantikörpern ausgewertet werden können. Die Borrelia burgdorferi IgG- und IgM-ELISA-Kits enthalten neben einem mit B. afzelii und B. garinii kreuzreagierenden Ganzzell-Antigenextrakt von Borrelia burgdorferi sensu stricto einen Anteil von reinem OspC von B. afzelii, wodurch die Sensitivität und die Spezifität der Tests erhöht werden. Liegt lediglich ein positives IgG-Ergebnis (IgM negativ) vor, kann man von einer Immunität des Probanden ausgehen. Wie oben erwähnt, sollte allerdings bei eindeutig klinischem Befund eine Überprüfung des Titeranstiegs mit dem gleichen Assay durchgeführt werden. Bei gleichzeitig positivem IgM-Befund ergibt sich ein Hinweis auf ein aktives Geschehen.

3. TESTPRINZIP

Der Borrelia IgM Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Borrelia burgdorferi-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgM-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Borrelia-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgM-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgM-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Komponenten	Volumen / Menge
Borrelia-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
Anti-human-IgM-Enzymkonjugat	15 mL
Substratlösung	15 mL
Stopp-Lösung	15 mL
Probenverdünner	60 mL
Waschpuffer (10x)	60 mL
Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Borrelia-Antigen (Mischung von Borrelia sensu stricto, Borrelia afzelii und Borrelia garinii). Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgM-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgM-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,021	
Negativ-Kontrolle	0,023	0,002
Cut-Off Standard	0,620	0,599
schwach Positiv-Kontrolle	1,002	0,981
Positiv-Kontrolle	2,421	2,400

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden.

Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Borrelia IgM Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.

Bei fraglich IgM positiven Ergebnissen bzw. zur Absicherung einer positiven Reaktion sollte eine Rheumafaktor-Absorption mit einem geeigneten Reagenz (Best.-Nr. DEMJS02, RF-Adsorbent) vorgenommen werden.








10. TESTCHARAKTERISTIKA

Borrelia burgdorferi ELISA	IgM
Intra-Assay-Präzision	5,0 %
Inter-Assay-Präzision	9,0 %
Inter-Lot-Präzision	4,8 – 10,3 %
Analytische Sensitivität	0,99 U/mL
Wiederfindung	110 – 111 %
Linearität	77 – 120 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen FSME
Interferenzen	Keine Interferenzen mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	100 %
Klinische Sensitivität	100 %

11. LITERATUR

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against Borrelia burgdorferi, J Clin Microbiol, 1992, 30:370-376
2. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against Borrelia burgdorferi in Bavarian forest workers, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263: 412-419
3. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, J Infect Dis, 1993; 167:392-400
4. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 1993; 16:208-214
5. Barbour AG, Hayes SF: Biology of Borrelia species, Microbiol Rev, 1986, 50:381-400
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis, Int J Syst Bacteriol 1992, 42:378-383
7. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgM antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, J Infect Dis, 1988, 158:754-760
8. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, Med Microbiol Immunol, 1994, 182:255-270
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European Borrelia burgdorferi strains, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263:92-102
10. Steere AC: Lyme Disease, New Engl J Med; 1989, 321:586-597

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Bordetella pertussis FHA IgG ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgG antibodies against Bordetella pertussis FHA in serum and plasma



DEBPT07



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE	3
2. GENERAL INFORMATION.....	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS	4
5. REAGENTS PROVIDED.....	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....	5
8. ASSAY PROCEDURE	6
9. EVALUATION	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES.....	8
1. VERWENDUNGSZWECK	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG.....	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN	11
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA	13
11. LITERATUR	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	16

1. INTENDED USE

The Bordetella FHA IgG Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgG antibodies against Bordetella FHA in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Whooping cough is a disease of the respiratory tracts which is caused by Bordetella pertussis bacteria. It is transmitted by airborne infection. The gramnegative Coccobacillus produces a series of biologically active molecules. The different compounds appear either during the pathogenesis or during the process of immunization against pertussis and show different effects. A characterisation has been made for the pertussis toxin (pt), the filamentary haemagglutinine (fha) and different lipopolysaccharides (lps).

Pertussis shows a high rate of transmission (rates of infection of over 90 % have been found for non-vaccinated household members) and can cause severe diseases, especially for very young children. In older children and adults the disease may manifests itself by unspecific brochitic symptoms or inflammation of the upper respiratory tract. School children which are not totally immune may develop whooping cough and infect younger children easily. This applies also to infected adults. The development of antibodies towards Bordetella pertussis during a pertussis disease reveals itself by a relatively long serologically negative initial phase, followed by a rapid increase of at first IgA und IgM antibodies and lastly IgG. Of 259 sera derived from children and adults with suspected whooping cough 142 were confirmed positive by an ELISA. Due to the broad application of Bordetella vaccines a significant reduction of the incidence and fatal casualties caused by whooping cough were achieved. A precise method for the quantification of the antibody concentration against Bordetella pertussis in serum is required to assess the success of a pertussis vaccination, diagnose an infection and detect diaplacental transfer of maternal antibodies.

FHA is a 220 kDa sized surface antigen of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis which agglutinates erythrocytes in vitro. It is a component of numerous vaccines. For this reason a simple, fast, sensitive and according to an international reference preparation calibrated ELISA test kit for the detection of Bordetella FHA IgG antibodies was developed.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Bordetella FHA IgG antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Bordetella FHA antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgG antibodies of the serum and the immobilized Bordetella FHA antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgG peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgG antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Symbol		Components	Volume / Qty.
SORB	MT	Bordetella FHA antigen coated microtiter strips	12
CAL	A	Calibrator A (Negative Control)	2 mL
CAL	B	Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL	C	Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
CAL	D	Calibrator D (Positive Control)	2 mL
ENZ	CONJ	Enzyme Conjugate	15 mL
SUB	TMB	Substrate	15 mL
STOP	SOLN	Stop Solution	15 mL
SAM	DIL	Sample Diluent	60 mL
WASH	SOLN	10x	60 mL
-		Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Bordetella FHA antigen (strain Tohama). Ready-to-use.

5.2. Standards

4 x 2 mL, human serum diluted with PBS, with 0, 25, 100 and 250 IU/mL of IgG antibodies against Bordetella FHA. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. The ready-to-use Bordetella FHA standards are calibrated against the **WHO reference preparation 06/140**.

5.3. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgG-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L ProclinTM. Ready-to-use.

5.4. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.5. Stop Solution

15 mL, 0.5 M sulfuric acid. Ready-to-use.

5.6. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.7. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

5.8. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.020	
Standard 1 (0 IU/mL)	0.030	0.010
Standard 1 (25 IU/mL)	0.507	0.487
Standard 1 (100 IU/mL)	1.531	1.511
Standard 1 (250 IU/mL)	2.492	2.472

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard (=25 IU/mL). If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The absorbance value of Standard 4 needs to be at least twice as high compared to Standard 2

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Bordetella FHA IgG antibody kit are calibrated using the **WHO reference preparation 06/140**. As such they are expressed in International Units (IU). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Standard 2 with its concentration of 25 IU/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 20 and 30 IU/mL are reported as borderline.

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Bordetella FHA ELISA	IgG
Intra-Assay-Precision	4.8 – 7.2 %
Inter-Assay-Precision	6.2 – 17.0 %
Inter-Lot-Precision	2.6 23.1 %
Analytical Sensitivity	0.5 IU/mL
Recovery	102 – 108 %
Linearity	80 – 134 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Adenovirus, Parainfluenza 1/2/3 and RSV.
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	86 %
Clinical Sensitivity	100 %
Measuring Range	25 – 250 IU/mL

11. REFERENCES

1. Chodorowska, M. et al. ELISA test used for serologic diagnosis of Pertussis. *Med. Dosw. Microbiol.*, **48**: 15 (1996).
2. Cherry et al.: The Epidemiology of Pertussis: A Comparison of the Epidemiology of the Disease Pertussis with the Epidemiology of Bordetella pertussis Infection. *Pediatrics* 115, 1422 (2005)
3. Finger, H. et al. Serological diagnosis of whooping cough. *Dev. Biol. Stand.*, **610**: 331 (1985).
4. Granström, G. et al. Specific Immunoglobulin A to bordetella pertussis antigen. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 869 (1988).
5. Kuno-Sakai, H. et al.: A simple and sensitive ELISA of antibodies to Pertussis antigens. *Vaccine* **10**: 350 (1992).
6. Nagel, J. et al.: Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **610**: 325 (1985).
7. Reizenstein, E. et al.: Comparison of five calculation modes for antibody ELISA against Pertussis. *J. Immunol. Methods* **183**: 279 (1995).
8. Sato, Y. et al.: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **73**: 167 (1991).
9. Steketee, R. W. et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis. *J. Infect. Dis.* **157**: 441 (1988).
10. Watanabe M. et al.: Characterization of serological responses to Pertussis ; *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (3), 314 (2006).
11. Riffelmann, M. et al.: Performance of commercial enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis, *J. Clin. Microbiol.* 48, 4459 (2010).
12. Wirsing von König, CH. et al.: Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children, *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 341 (1999).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Bordetella FHA IgG ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgG-Antikörpern gegen Bordetella Filamentöses Hämagglutinin (FHA) im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Keuchhusten ist eine Krankheit der Atemwege, die durch Bordetella pertussis Bakterien hervorgerufen und durch Tröpfcheninfektion übertragen wird. Der zugrundeliegende gramnegative Coccobacillus erzeugt eine Reihe von biologisch aktiven Verbindungen. Die verschiedenen Komponenten erscheinen entweder während der Pathogenese oder der Immunisierung gegen Pertussis und zeigen eine unterschiedliche Wirkung. Charakterisiert wurden in diesem Zusammenhang das Pertussis Toxin (PT), das filamentäre Hämagglutinin (FHA) sowie verschiedene Lipopolysaccharide (LPS).

Pertussis zeigt eine hohe Übertragungshäufigkeit (es wurden Infektionsraten von über 90 % bei nicht-geimpften Haushaltsangehörigen gefunden) und kann eine ernsthafte Erkrankung besonders bei sehr jungen Kindern hervorrufen. Bei älteren Kindern und Erwachsenen (einschließlich bereits geimpfter Personen) kann sich die Infektion durch eine unspezifische Bronchitissymptomatik oder eine Entzündung der oberen Atemwege manifestieren. Schulkinder, die nicht völlig immunisiert sind und Pertussis entwickeln, können leicht jüngere Kinder anstecken. Dies gilt auch für den infizierten Erwachsenen. Die Entwicklung der Antikörper gegen Bordetella pertussis während einer Keuchhustenerkrankung zeigt eine relativ lange serologisch negative Vorphase, gefolgt von einem schnellen Anstieg von zuerst IgA und IgM Antikörpern, zum Schluss erscheint IgG. In 259 Seren von Kindern und Erwachsenen mit Verdacht auf Keuchhusten wurden mit einem ELISA 142 positive Fälle gefunden. Durch die breite Anwendung von Bordetella-Impfstoffen wurde eine deutliche Verminderung der Inzidenz und der Todesfälle bei Keuchhusten erreicht. Eine genaue Methode zur Quantifizierung der Antikörperspiegel im Serum gegen Bordetella pertussis ist erforderlich, um die Wirkung der Pertussis-Impfung zu ermessen, Infektionen zu diagnostizieren und transplazentär übertragene mütterliche Antikörper zu entdecken.

Bei FHA handelt es sich um ein 220 kDa großes Oberflächenantigen von Bordetella pertussis und Bordetella parapertussis, das in vitro Erythrocyten agglutiniert. FHA ist Bestandteil zahlreicher Impfstoffe. Aus diesem Grunde wurde ein einfacher, schneller, empfindlicher und nach einer internationalen Referenzpräparation standardisierter ELISA-Test zum Nachweis von Bordetella FHA IgG-Antikörpern entwickelt.

3. TESTPRINZIP

Der Bordetella FHA IgG Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Bordetella FHA-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgG-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Bordetella FHA-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgG-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgG-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 – 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Symbol	Komponenten	Volumen / Menge
SORB MT	Bordetella FHA-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
CAL A	Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
CAL B	Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
CAL D	Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
ENZ CONJ	Anti-human-IgG-Enzymkonjugat	15 mL
SUB TMB	Substratlösung	15 mL
STOP SOLN	Stopp-Lösung	15 mL
SAM DIL	Probenverdünner	60 mL
WASH SOLN 10x	Waschpuffer (10x)	60 mL
-	Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Bordetella FHA-Antigen (Stamm Tohama). Gebrauchsfertig.

5.2. Standards

0, 25, 100, 250 IU/mL; je 2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält IgG Antikörper gegen Bordetella FHA. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Die gebrauchsfertigen Bordetella FHA-Standards sind auf Internationale Units (IU) eingestellt und gegen das WHO Referenzpräparat 06/140 kalibriert worden.

5.3. Anti-human-IgG-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgG-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.4. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.5. Stopp-Lösung

15 mL, 0,5 M Schwefelsäure. Gebrauchsfertig.

5.6. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.7. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.8. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,020	
Standard 1 (0 IU/mL)	0,030	0,010
Standard 2 (25 IU/mL)	0,507	0,487
Standard 3 (100 IU/mL)	1,531	1,511
Standard 4 (250 IU/mL)	2,492	2,472

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard (=25 IU/mL) verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden.

Der Standard 4 muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit Standard 2 zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Bordetella FHA IgG Antikörper-Kits sind auf Internationale Units (IU) eingestellt und gegen das **WHO Referenzpräparat 06/140** kalibriert worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Standard 2 mit einer Konzentration von 25 IU/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 20 und 30 U/ml als grenzwertig befundet.






10. TESTCHARAKTERISTIKA

Bordetella FHA ELISA	IgG
Intra-Assay-Präzision	4,8 – 7,2 %
Inter-Assay-Präzision	6,2 – 17,0 %
Inter-Lot-Präzision	2,6 – 23,1 %
Analytische Sensitivität	0,5 IU/mL
Wiederfindung	102 – 108 %
Linearität	80 – 134 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität auf Adenovirus, Parainfluenza 1/2/3 und RSV.
Interferenzen	Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL.
Klinische Spezifität	86 %
Klinische Sensitivität	100 %
Messbereich	25 – 250 IU/mL

11. LITERATUR

1. Chodorowska, M. et al. ELISA test used for serologic diagnosis of Pertussis. *Med. Dosw. Microbiol.*, **48**: 15 (1996).
2. Cherry et al.: The Epidemiology of Pertussis: A Comparison of the Epidemiology of the Disease Pertussis with the Epidemiology of Bordetella pertussis Infection. *Pediatrics* 115, 1422 (2005)
3. Finger, H. et al. Serological diagnosis of whooping cough. *Dev. Biol. Stand.*, **610**: 331 (1985).
4. Granström, G. et al. Specific Immunoglobulin A to bordetella pertussis antigen. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 869 (1988).
5. Kuno-Sakai, H. et al.: A simple and sensitive ELISA of antibodies to Pertussis antigens. *Vaccine* **10**: 350 (1992).
6. Nagel, J. et al.: Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **610**: 325 (1985).
7. Reizenstein, E. et al.: Comparison of five calculation modes for antibody ELISA against Pertussis. *J. Immunol. Methods* **183**: 279 (1995).
8. Sato, Y. et al.: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **73**: 167 (1991).
9. Steketee, R. W. et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis. *J. Infect. Dis.* **157**: 441 (1988).
10. Watanabe M. et al. : Characterization of serological responses to Pertussis ; *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (3), 314 (2006).
11. Riffelmann, M. et al.: Performance of commercial enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis, *J. Clin. Microbiol.* 48, 4459 (2010).
12. Wirsing von König, CH. et al.: Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children, *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 341 (1999).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts- kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits- datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Helicobacter pylori IgG ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgG antibodies against Helicobacter pylori in serum and plasma



DEHEL01



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS.....	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION.....	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG.....	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS.....	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11. LITERATUR.....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Helicobacter pylori IgG Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgG antibodies against Helicobacter pylori in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Helicobacter pylori, a 2.5-3 µm long, twisted or helical gram-negative germ is responsible for 80-90% of B-gastritis cases and is suspected to be a major cofactor for the development of gastric and duodenal ulcers. Up to now Helicobacter pylori could be most reliably detected by culturing from mucous membrane biopsies; also a urease test was employed for identification. These detection methods are only successful for a relatively high germ count from the inoculate and require an identification directly after taking the biopsy. Recently it was shown that a detection of Helicobacter pylori by indirect immunofluorescence (IIF) should be superior to the above methods. The identification by IIF is also advantageous as it is not necessary to perform the determination directly after the biopsy; thus preparations can be sent to specialized laboratories. The colonisation of the gastric and duodenal mucous membranes by Helicobacter pylori can also be detected serologically by the performance of an enzyme immunoassay (ELISA) or by Western Blot. Patients with confirmed exposition to Helicobacter pylori often show a positive serological result. Since antibodies persist for a longer time after a Helicobacter pylori infection, seropositive individuals are also found among symptom-free patients. The ratio of seropositive values rises with age. By the determination of immunoglobulins in ELISA and by the detection of IgG, IgA and IgM antibodies against specific proteins of Helicobacter pylori in the Western Blot, it should be possible to diagnose an acute infection with Helicobacter pylori, even if no germs can be found. The detection of Helicobacter pylori is of remarkable interest for the therapy. Bismuth salts and antibiotics use to kill the germs, and these should complement or replace the usual therapy with antacidic and H2 blocking agents. Serological monitoring could thus also be employed to control the success of anti-microbial therapy.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Helicobacter pylori IgG antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Helicobacter antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgG antibodies of the serum and the immobilized Helicobacter antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgG peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgG antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Components	Volume / Qty.
Helicobacter pylori antigen coated microtiter strips	12
Calibrator A (Negative Control)	2 mL
Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
Calibrator D (Positive Control)	2 mL
Enzyme Conjugate	15 mL
Substrate	15 mL
Stop Solution	15 mL
Sample Diluent	60 mL
Washing Buffer (10×)	60 mL
Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Mikrotiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with purified natural Helicobacter pylori antigen. Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgG antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01% methylisothiazolone and 0.01% bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgG antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgG antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgG antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01% methylisothiazolone and 0.01% bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgG-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L ProclinTM. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8 °C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20 °C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8 °C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.015	
Negative Control	0.024	0.009
Cut-Off Standard	0.460	0.445
Weak Positive Control	1.084	1.069
Positive Control	2.213	2.198

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Helicobacter pylori IgG antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Helicobacter pylori ELISA	IgG
Intra-Assay-Precision	8.5 %
Inter-Assay-Precision	6.3 %
Inter-Lot-Precision	3.6 – 10.8 %
Analytical Sensitivity	1.16 U/mL
Recovery	90 – 93 %
Linearity	82 – 118 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Yersinia enterocolitis
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	96 %
Clinical Sensitivity	96 %

11. REFERENCES

1. Cover TL et al. Serologic detection of infection with cagA+ Helicobacter pylori strains. J. Clin. Microbiol., **33**: 1496 (1995).
2. Cutler AF et al. Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection. Gastroenterology, **109**: 136 (1966).
3. Dhar R et al. Evaluation and comparison of two immunodiagnostic assays for Helicobacter pylori antibodies with culture results. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **30**: 1 (1998).
4. Dixon MF. Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol., **6**: 125 (1991).
5. Donati M et al. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with Helicobacter pylori-induced gastritis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., **4**: 478 (1997).
6. Evans DJ et al. A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection. Gastroenterology, **96**: 1004 (1989).
7. Gosciniak G. IgG and IgA antibodies in Helicobacter pylori infections. Zentralbl. Bakteriol., **286**: 494 (1997).
8. Heikkinen M et al. Usefulness of anti-Helicobacter pylori and anti-CagA antibodies in the selection of patients for gastroscopy. Am. J. Gastroenterol., **92**: 2225 (1997).
9. Karvar S et al. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of Helicobacter pylori infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. J. Clin. Microbiol., **35**: 3058 (1997).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Helicobacter pylori IgG ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgG-Antikörpern gegen Helicobacter im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Helicobacter pylori, ein gramnegatives, spiralförmiges Bakterium mit Flagellen, das die Mukosa des Magens und des Dünndarms besiedelt, wurde 1984 von Warren und Marshall entdeckt. Seitdem weiß man, daß H. pylori ein primärer Verursacher bei der Entwicklung von Magen- und Dünndarm-Ulzera, chronisch-aktiver Gastritis, primärem gastrischen B-Zell-Lymphom sowie Adenokarzinom des Magens ist. Beim Dünndarmulkus wurde eine Infektionsrate von 93 % und beim Magenulkus von 80 % gefunden. Die Behandlung der Patienten mit Kombinationen von H₂-Blockern, Wismut und Antibiotika führte zu Heilungsraten von bis zu 90 %. Wenn die H. pylori Infektion erfolgreich behandelt ist, liegt die Häufigkeit einer Reinfektion bei unter 0,5 % / Jahr. Im Jahre 1994 stellte die NIH Consensus Conference fest, daß H. pylori einen peptischem Ulkus auslöst, und empfiehlt eine antimikrobielle Therapie.

Es gibt eine Reihe von anerkannten Methoden zur Diagnose von H. pylori Infektionen. Bis vor kurzem war die Methode der Wahl die Endoskopie und Biopsie gekoppelt mit einem schnellen Ureasetest sowie Kulturanzüchtung und Histologie. Diese Methoden erfordern jedoch spezielle Geräte und sind personalintensiv. Da man erkannte, dass die H. pylori Infektion mit einer systemischen Immunantwort verbunden ist, wurden als preiswerte Alternative Enzymimmunoassays sowie als Bestätigungstests Western-Blot Verfahren zum Nachweis von IgG, IgA und IgM Antikörpern gegen den Erreger entwickelt. Gegenüber der KBR sowie Latex-Agglutinationsmethoden lassen sich einzelne Immunglobulinklassen differenzieren, wodurch Aussagen über das Stadium der Erkrankung möglich sind. Die Spezifität und die Sensitivität der Tests konnte durch Verwendung von gereinigten Antigenen unter Einschluss der hochmolekularen CagA und VacA Proteine verbessert werden.

Der Vorteil der ELISA Methode beruht auf der Möglichkeit, die verschiedenen Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM getrennt nachzuweisen, womit eine eindeutige Zuordnung zu einer frischen oder einer abgelaufenen Infektion möglich wird.

3. TESTPRINZIP

Der Helicobacter IgG Antikörpertest basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Helicobacter pylori-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgG-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Helicobacter-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgG-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgG-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Komponenten	Volumen / Menge
Helicobacter-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
Anti-human-IgG-Enzymkonjugat	15 mL
Substratlösung	15 mL
Stopp-Lösung	15 mL
Probenverdünner	60 mL
Waschpuffer (10x)	60 mL
Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Helicobacter-Antigen. Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon u. 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgG-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgG-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,015	
Negativ-Kontrolle	0,024	0,009
Cut-Off Standard	0,460	0,445
schwach Positiv-Kontrolle	1,084	1,069
Positiv-Kontrolle	2,213	2,198

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden.

Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Helicobacter IgG Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.










10. TESTCHARAKTERISTIKA

Helicobacter pylori ELISA	IgG
Intra-Assay-Präzision	8,5 %
Inter-Assay-Präzision	6,3 %
Inter-Lot-Präzision	3,6 – 10,8 %
Analytische Sensitivität	1,16 U/mL
Wiederfindung	90 – 93 %
Linearität	82 – 118 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen Yersinia enterocolitis
Interferenzen	Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	96 %
Klinische Sensitivität	96 %

11. LITERATUR

1. Cutler, A.F. et al.: Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection; Gastroenterology 109, 136 (1966).
2. Dixon, M.F.: Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol. 6, 125 (1991).
3. Evans, D.J. et al.: A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection; Gastroenterology 96, 1004 (1989).
4. Marshall, B.J. et al.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulcer; Lancet 325, 1311 (1984).
5. Meijer, B.C. et al.: Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against Helicobacter pylori; J Clin Microbiol 35, 292 (1997).
6. Newell, D.G. et al.: An enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Campylobacter pylori-associated gastritis; Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 142, 53 (1988).
7. Rechcinski, T. et al.: Serological indicators of Helicobacter pylori infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors; Microbiol Immunol 41, 387 (1997).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Helicobacter pylori IgA ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgA antibodies against Helicobacter pylori in serum and plasma



DEHEL02



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS.....	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION.....	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG.....	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS.....	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11. LITERATUR.....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Helicobacter pylori IgA Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgA antibodies against Helicobacter pylori in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Helicobacter pylori, a 2.5-3 µm long, twisted or helical gram-negative germ is responsible for 80-90% of B-gastritis cases and is suspected to be a major cofactor for the development of gastric and duodenal ulcers. Up to now Helicobacter pylori could be most reliably detected by culturing from mucous membrane biopsies; also a urease test was employed for identification. These detection methods are only successful for a relatively high germ count from the inoculate and require an identification directly after taking the biopsy. Recently it was shown that a detection of Helicobacter pylori by indirect immunofluorescence (IIF) should be superior to the above methods. The identification by IIF is also advantageous as it is not necessary to perform the determination directly after the biopsy; thus preparations can be sent to specialized laboratories. The colonisation of the gastric and duodenal mucous membranes by Helicobacter pylori can also be detected serologically by the performance of an enzyme immunoassay (ELISA) or by Western Blot. Patients with confirmed exposition to Helicobacter pylori often show a positive serological result. Since antibodies persist for a longer time after a Helicobacter pylori infection, seropositive individuals are also found among symptom-free patients. The ratio of seropositive values rises with age. By the determination of immunoglobulins in ELISA and by the detection of IgG, IgA and IgM antibodies against specific proteins of Helicobacter pylori in the Western Blot, it should be possible to diagnose an acute infection with Helicobacter pylori, even if no germs can be found. The detection of Helicobacter pylori is of remarkable interest for the therapy. Bismuth salts and antibiotics use to kill the germs, and these should complement or replace the usual therapy with antacidic and H2 blocking agents. Serological monitoring could thus also be employed to control the success of anti-microbial therapy.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Helicobacter pylori IgA antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Helicobacter antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgA antibodies of the serum and the immobilized Helicobacter antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgA peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgA antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Components	Volume / Qty.
Helicobacter pylori antigen coated microtiter strips	12
Calibrator A (Negative Control)	2 mL
Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
Calibrator D (Positive Control)	2 mL
Enzyme Conjugate	15 mL
Substrate	15 mL
Stop Solution	15 mL
Sample Diluent	60 mL
Washing Buffer (10x)	60 mL
Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Mikrotiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with purified natural Helicobacter pylori antigen. Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgA antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01% methylisothiazolone and 0.01% bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgA antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgA antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgA antibodies against Helicobacter. Addition of 0.01% methylisothiazolone and 0.01% bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgA-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L Proclin™. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.019	
Negative Control	0.068	0.049
Cut-Off Standard	0.574	0.555
Weak Positive Control	1.001	0.982
Positive Control	2.148	2.129

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Helicobacter pylori IgA antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Helicobacter pylori ELISA	IgA
Intra-Assay-Precision	8.1 %
Inter-Assay-Precision	9.4 %
Inter-Lot-Precision	3.3 – 10.5 %
Analytical Sensitivity	1.04 U/mL
Recovery	113 – 126 %
Linearity	77 – 125 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Yersinia enterocolitis
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	95 %
Clinical Sensitivity	83 %

11. REFERENCES

1. Cover TL et al. Serologic detection of infection with cagA+ Helicobacter pylori strains. J. Clin. Microbiol., **33**: 1496 (1995).
2. Cutler AF et al. Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection. Gastroenterology, **109**: 136 (1966).
3. Dhar R et al. Evaluation and comparison of two immunodiagnostic assays for Helicobacter pylori antibodies with culture results. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **30**: 1 (1998).
4. Dixon MF. Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol., **6**: 125 (1991).
5. Donati M et al. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with Helicobacter pylori-induced gastritis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., **4**: 478 (1997).
6. Evans DJ et al. A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection. Gastroenterology, **96**: 1004 (1989).
7. Gosciniak G. IgG and IgA antibodies in Helicobacter pylori infections. Zentralbl. Bakteriologie, **286**: 494 (1997).
8. Heikkinen M et al. Usefulness of anti-Helicobacter pylori and anti-CagA antibodies in the selection of patients for gastroscopy. Am. J. Gastroenterol., **92**: 2225 (1997).
9. Karvar S et al. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of Helicobacter pylori infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. J. Clin. Microbiol., **35**: 3058 (1997).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Helicobacter pylori IgA ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgA-Antikörpern gegen Helicobacter im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Helicobacter pylori, ein gramnegatives, spiralförmiges Bakterium mit Flagellen, das die Mukosa des Magens und des Dünndarms besiedelt, wurde 1984 von Warren und Marshall entdeckt. Seitdem weiß man, daß H. pylori ein primärer Verursacher bei der Entwicklung von Magen- und Dünndarm-Ulzera, chronisch-aktiver Gastritis, primärem gastrischen B-Zell-Lymphom sowie Adenokarzinom des Magens ist. Beim Dünndarmulkus wurde eine Infektionsrate von 93 % und beim Magenulkus von 80 % gefunden. Die Behandlung der Patienten mit Kombinationen von H₂-Blockern, Wismut und Antibiotika führte zu Heilungsraten von bis zu 90 %. Wenn die H. pylori Infektion erfolgreich behandelt ist, liegt die Häufigkeit einer Reinfektion bei unter 0,5 % / Jahr. Im Jahre 1994 stellte die NIH Consensus Conference fest, daß H. pylori einen peptischem Ulkus auslöst, und empfiehlt eine antimikrobielle Therapie.

Es gibt eine Reihe von anerkannten Methoden zur Diagnose von H. pylori Infektionen. Bis vor kurzem war die Methode der Wahl die Endoskopie und Biopsie gekoppelt mit einem schnellen Ureasetest sowie Kulturanzucht und Histologie. Diese Methoden erfordern jedoch spezielle Geräte und sind personalintensiv. Da man erkannte, dass die H. pylori Infektion mit einer systemischen Immunantwort verbunden ist, wurden als preiswerte Alternative Enzymimmunoassays sowie als Bestätigungstests Western-Blot Verfahren zum Nachweis von IgG, IgA und IgM Antikörpern gegen den Erreger entwickelt. Gegenüber der KBR sowie Latex-Agglutinationsmethoden lassen sich einzelne Immunglobulinklassen differenzieren, wodurch Aussagen über das Stadium der Erkrankung möglich sind. Die Spezifität und die Sensitivität der Tests konnte durch Verwendung von gereinigten Antigenen unter Einschluss der hochmolekularen CagA und VacA Proteine verbessert werden.

Der Vorteil der ELISA Methode beruht auf der Möglichkeit, die verschiedenen Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM getrennt nachzuweisen, womit eine eindeutige Zuordnung zu einer frischen oder einer abgelaufenen Infektion möglich wird.

3. TESTPRINZIP

Der Helicobacter IgA Antikörpertest basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Helicobacter pylori-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgA-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Helicobacter-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgA-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgA-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Komponenten	Volumen / Menge
Helicobacter-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
Anti-human-IgA-Enzymkonjugat	15 mL
Substratlösung	15 mL
Stopp-Lösung	15 mL
Probenverdünner	60 mL
Waschpuffer (10x)	60 mL
Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Helicobacter-Antigen. Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgA-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgA-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgA-Antikörpern gegen Helicobacter. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon u. 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgA-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgA-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,019	
Negativ-Kontrolle	0,068	0,049
Cut-Off Standard	0,574	0,555
schwach Positiv-Kontrolle	1,001	0,982
Positiv-Kontrolle	2,148	2,129

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden.

Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Helicobacter IgA Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.




10. TESTCHARAKTERISTIKA

Helicobacter pylori ELISA	IgA
Intra-Assay-Präzision	8,1 %
Inter-Assay-Präzision	9,4 %
Inter-Lot-Präzision	3,3 – 10,5 %
Analytische Sensitivität	1,04 U/mL
Wiederfindung	113 – 126 %
Linearität	77 – 125 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen Yersinia enterocolitis
Interferenzen	Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	95 %
Klinische Sensitivität	83 %

11. LITERATUR

1. Cutler, A.F. et al.: Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection; Gastroenterology 109, 136 (1966).
2. Dixon, M.F.: Helicobacter pylori and peptic ulceration; J. Gastroenterol. Hepatol. 6, 125 (1991).
3. Evans, D.J. et al.: A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection; Gastroenterology 96, 1004 (1989).
4. Marshall, B.J. et al.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulcer; Lancet 325, 1311 (1984).
5. Meijer, B.C. et al.: Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against Helicobacter pylori; J Clin Microbiol 35, 292 (1997).
6. Newell, D.G. et al.: An enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Campylobacter pylori-associated gastritis; Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 142, 53 (1988).
7. Rechcinski, T. et al.: Serological indicators of Helicobacter pylori infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors; Microbiol Immunol 41, 387 (1997).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Mumps IgG ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgG antibodies against Mumps Virus in serum and plasma



DEMUM01



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE	3
2. GENERAL INFORMATION.....	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS	4
5. REAGENTS PROVIDED.....	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....	6
8. ASSAY PROCEDURE	6
9. EVALUATION	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES.....	8
1. VERWENDUNGSZWECK	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG.....	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA	13
11. LITERATUR	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	16

1. INTENDED USE

The Mumps IgG Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgG antibodies against Mumps virus in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC. Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Mumps (Parotitis) is a common contagious disease with relatively moderate symptoms during childhood, but increasing complications, when adults are infected. The causative agent of mumps is a virus of the Paramyxoviridae family. The virus normally infects children at the age of 4 to 10. The infection is mainly transmitted by the airborne route, but is also spread by various objects contaminated by the patient saliva. The disease shows a seasonal prevalence with the greatest incidence in winter and spring. Both a mumps infection or vaccination lead to a persistent immunity. The typical symptom associated with a mumps infection is a „parotitis“ (swelling of the parotid glands). Additionally pathological involvement of the CNS and various glandular organs (pancreas, thymus, thyroids) is a typical feature of mumps. A mumps induced meningitis is one of the most frequent manifestations of the disease which can also appear without parotitis. The published data about the presence of meningitis vary between 1.4% and 66% of the clinically ill patients. In most cases there follows reconvalescence without complications. The recognition of Mumps in the laboratory is mostly done by detection of the infectious agent itself or by the determination of virus-specific antibodies. The serodiagnosis plays a major part. Besides the classical methods like complement fixation, hemagglutination and neutralisation tests have been introduced a series of modern assays like immunofluorescence, radio immunoassay and enzyme immunoassay. The immunity of an individual is monitored by an IgG ELISA. Increasing IgG titers are helpful in the determination of the causative agent because cross reactions with Parainfluenza-Virus type 2 may lead to a wrong interpretation of the patient reports. In the early stage of the disease, significant IgM titers may be monitored.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Mumps IgG antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Mumps antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgG antibodies of the serum and the immobilized Mumps antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgG peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgG antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Symbol	Components	Volume / Qty.
SORB MT	Mumps antigen coated microtiter strips	12
CAL A	Calibrator A (Negative Control)	2 mL
CAL B	Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
CAL D	Calibrator D (Positive Control)	2 mL
ENZ CONJ	Enzyme Conjugate	15 mL
SUB TMB	Substrate	15 mL
STOP SOLN	Stop Solution	15 mL
SAM DIL	Sample Diluent	60 mL
WASH SOLN 10x	Washing Buffer (10x)	60 mL
-	Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Mumps antigen (Strain Enders, ATCC VR-106). Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgG antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgG antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgG antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgG antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgG-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L Proclin™. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results. For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Residuals of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Residuals of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.018	
Negative Control	0.052	0.034
Cut-Off Standard	0.513	0.495
Weak Positive Control	1.317	1.299
Positive Control	2.177	2.159

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run. The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Mumps IgG antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet. For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen. Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Mumps ELISA	IgG
Intra-Assay-Precision	8.9 %
Inter-Assay-Precision	7.8 %
Inter-Lot-Precision	1.3 – 13.8 %
Analytical Sensitivity	1.28 U/mL
Recovery	72 – 101 %
Linearity	82 – 130 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Measles and Varicella zoster
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	88 %
Clinical Sensitivity	100 %

11. REFERENCES

1. Bayas, JM. et al. Susceptibility to measles, rubella and parotitis in young adults. *Med. Clin. (Barc)*, **106**(15): 561-4 (1996).
2. Chomel, JJ. et al. Rapid direct diagnosis of mumps meningitis by ELISA capture technique. *J. Virol. Methods*, **68**(1): 97-104 (1997).
3. Gut, JP. et al. Symptomatic mumps virus reinfections. *J. Med. Virol.*, **45**(1): 17-23 (1995).
4. Johnson, CE. et al. Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **15**(8): 687-92 (1996).
5. King, SM. et al. Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, **17**(4): 633-6 (1996).
6. Matter, L. et al. Age-stratified seroprevalence of measles, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. *Eur. J. Epidemiol.*, **13**(1): 61-6 (1997).
7. Pison Garces, FJ. et al. Immunity to measles, mumps and rubella in children vaccinated with triple viral vaccine. *Aten. Primaria*, **15**(4): 235-7 (1995).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Mumps-IgG-ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgG-Antikörpern gegen Mumps im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden. Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Der Mumps ist im Kindesalter eine vorwiegend milde verlaufende Allgemeinerkrankung, die jedoch mit zunehmendem Alter der Patienten schwerere Verläufe zeigt. Die Krankheit entsteht durch eine Infektion mit dem Mumpsvirus, das zu der Familie Paramyxoviridae gehört. Normalerweise werden Kinder im Alter zwischen 4 und 10 Jahren infiziert. Das Virus breitet sich über Tröpfcheninfektion oder direktem Kontakt mit dem Speichel des Patienten aus. Saisonell tritt das Virus am häufigsten im Winter und Frühjahr auf. Nach durchlaufener Infektion oder durch eine Impfung wird eine andauernde Immunität erreicht. Neben der Parotitis als Leitsymptom sind häufig auch andere Organe von der Krankheit betroffen, wie das ZNS und lymphatische Gewebe. Die Mumps-Meningitis ist eine häufige Manifestation der Erkrankung. Sie tritt nicht selten ohne Parotitis auf. Die Angaben über die Häufigkeit schwanken zwischen 1,4 % und 66 % der klinisch Erkrankten. In den meisten Fällen heilt sie komplikationslos aus. Die labordiagnostische Bestätigung des Mumps wird durch den Erregernachweis oder durch die Bestimmung erregerspezifischer Antikörper geführt. Die Serodiagnostik spielt hierbei die größere Rolle. Neben den klassischen Methoden wie KBR, HAH und NT stehen der Immunfluoreszenztest, der Hämolyse-in-Gel-Test, der Radioimmunoassay sowie der Enzymimmunoassay zur Verfügung. Eine Immunität kann über den IgG ELISA nachgewiesen werden. Da eine Kreuzreaktion mit dem Parainfluenza-Virus (Typ 2) zu falschen Ergebnissen führen kann, sind steigende IgG-Titer hilfreich bei der Feststellung des auslösenden Agens. Zu Beginn der Erkrankung liegen in der Regel hohe IgM-Titer vor. Der Vorteil der ELISA Methode beruht auf der Möglichkeit, die verschiedenen Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM getrennt nachzuweisen, womit eine eindeutige Zuordnung zu einer frischen oder einer abgelaufenen Infektion möglich wird.

3. TESTPRINZIP

Der Mumps-IgG-Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Mumps-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgG-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Mumps-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgG-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgG-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Symbol	Komponenten	Volumen / Menge
SORB MT	Mumps-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
CAL A	Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
CAL B	Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
CAL D	Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
ENZ CONJ	Anti-human-IgG-Enzymkonjugat	15 mL
SUB TMB	Substratlösung	15 mL
STOP SOLN	Stopp-Lösung	15 mL
SAM DIL	Probenverdünner	60 mL
WASH SOLN 10x	Waschpuffer (10×)	60 mL
-	Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Mumps-Antigen (Stamm Enders (ATCC VR-106)). Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgG-Antikörpern gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgG-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgG-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l Proclin™. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,020	
Negativ-Kontrolle	0,150	0,130
Cut-Off Standard	0,520	0,500
schwach Positiv-Kontrolle	1,100	1,080
Positiv-Kontrolle	1,500	1,480

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden. Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Mumps IgG Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben. Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden. Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.






10. TESTCHARAKTERISTIKA

Mumps ELISA	IgG
Intra-Assay-Präzision	8,9 %
Inter-Assay-Präzision	7,8 %
Inter-Lot-Präzision	1,3 – 13,8 %
Analytische Sensitivität	1,28 U/mL
Wiederfindung	72 – 101 %
Linearität	82 – 130 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen Masern und Varizella zoster
Interferenzen	Keine Interferenzen mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	88 %
Klinische Sensitivität	100 %

11. LITERATUR

1. Bayas JM et al.: Susceptibility to measles, rubella and parotitis in young adults. *Med Clin (Barc)* 1996 Apr 20; 106(15):561-4.
2. Chomel JJ et al.: Rapid direct diagnosis of mumps meningitis by ELISA capture technique. *J Virol Methods* 1997 Oct; 68(1):97-104.
3. Gut JP et al.: Symptomatic mumps virus reinfections. *J Med Virol* 1995 Jan; 45(1):17-23.
4. Johnson CE et al.: Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. *Pediatr Infect Dis J* 1996 Aug; 15(8): 687-92.
5. King SM et al.: Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1996 Apr; 17(4):633-6.
6. Matter L et al.: Age-stratified seroprevalence of measles, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. *Eur J Epidemiol* 1997 Jan; 13(1):61-6.
7. Pison Garces et al.: Immunity to measles, mumps and rubella in children vaccinated with triple viral vaccine. *Aten Primaria* 1995 Mar 15; 15(4):235-7.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Mumps IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgM antibodies against Mumps Virus in serum and plasma



DEMUM03



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE	3
2. GENERAL INFORMATION.....	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS	4
5. REAGENTS PROVIDED.....	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....	6
8. ASSAY PROCEDURE	6
9. EVALUATION	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	8
11. REFERENCES.....	8
1. VERWENDUNGSZWECK	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG.....	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA	14
11. LITERATUR	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	16

1. INTENDED USE

The Mumps IgM Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgM antibodies against Mumps virus in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC. Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Mumps (Parotitis) is a common contagious disease with relatively moderate symptoms during childhood, but increasing complications, when adults are infected. The causative agent of mumps is a virus of the Paramyxoviridae family. The virus normally infects children at the age of 4 to 10. The infection is mainly transmitted by the airborne route, but is also spread by various objects contaminated by the patient saliva. The disease shows a seasonal prevalence with the greatest incidence in winter and spring. Both a mumps infection or vaccination lead to a persistent immunity. The typical symptom associated with a mumps infection is a „parotitis“ (swelling of the parotid glands). Additionally pathological involvement of the CNS and various glandular organs (pancreas, thymus, thyroids) is a typical feature of mumps. A mumps induced meningitis is one of the most frequent manifestations of the disease which can also appear without parotitis. The published data about the presence of meningitis vary between 1.4% and 66% of the clinically ill patients. In most cases there follows reconvalescence without complications. The recognition of Mumps in the laboratory is mostly done by detection of the infectious agent itself or by the determination of virus-specific antibodies. The serodiagnosis plays a major part. Besides the classical methods like complement fixation, hemagglutination and neutralisation tests have been introduced a series of modern assays like immunofluorescence, radio immunoassay and enzyme immunoassay. The immunity of an individual is monitored by an IgG ELISA. Increasing IgG titers are helpful in the determination of the causative agent because cross reactions with Parainfluenza-Virus type 2 may lead to a wrong interpretation of the patient reports. In the early stage of the disease, significant IgM titers may be monitored.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Mumps IgM antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Mumps antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgM antibodies of the serum and the immobilized Mumps antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgM peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgM antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Symbol	Components	Volume / Qty.
SORB MT	Mumps antigen coated microtiter strips	12
CAL A	Calibrator A (Negative Control)	2 mL
CAL B	Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
CAL D	Calibrator D (Positive Control)	2 mL
ENZ CONJ	Enzyme Conjugate	15 mL
SUB TMB	Substrate	15 mL
STOP SOLN	Stop Solution	15 mL
SAM DIL	Sample Diluent	60 mL
WASH SOLN 10x	Washing Buffer (10x)	60 mL
-	Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Mumps antigen (Strain Enders, ATCC VR-106). Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgM antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgM antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgM antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgM antibodies against Mumps. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgM-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L Proclin™. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results. For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.010	
Negative Control	0.017	0.007
Cut-Off Standard	0.419	0.409
Weak Positive Control	0.876	0.866
Positive Control	1.729	1.719

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run. The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Mumps IgM antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet. For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen. Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline. For doubtful IgM positive results and for the confirmation of positive reactions the absorption of Rheumatoid Factor should be conducted with an appropriate reagent (Cat. No. DEMJS02, RF-Adsorbent).

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Mumps ELISA	IgM
Intra-Assay-Precision	8.7 %
Inter-Assay-Precision	6.8 %
Inter-Lot-Precision	4.2 – 9.5 %
Analytical Sensitivity	1.23 U/mL
Recovery	121 – 128 %
Linearity	78 – 135 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Measles and Varicella zoster
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	75 %
Clinical Sensitivity	100 %

11. REFERENCES

1. Bayas, JM. et al. Susceptibility to measles, rubella and parotitis in young adults. *Med. Clin. (Barc)*, **106**(15): 561-4 (1996).
2. Chomel, JJ. et al. Rapid direct diagnosis of mumps meningitis by ELISA capture technique. *J. Virol. Methods*, **68**(1): 97-104 (1997).
3. Gut, JP. et al. Symptomatic mumps virus reinfections. *J. Med. Virol.*, **45**(1): 17-23 (1995).
4. Johnson, CE. et al. Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **15**(8): 687-92 (1996).
5. King, SM. et al. Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, **17**(4): 633-6 (1996).
6. Matter, L. et al. Age-stratified seroprevalence of measles, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. *Eur. J. Epidemiol.*, **13**(1): 61-6 (1997).
7. Pison Garces, FJ. et al. Immunity to measles, mumps and rubella in children vaccinated with triple viral vaccine. *Aten. Primaria*, **15**(4): 235-7 (1995).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Mumps-IgM-ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgM-Antikörpern gegen Mumps im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden. Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Der Mumps ist im Kindesalter eine vorwiegend milde verlaufende Allgemeinerkrankung, die jedoch mit zunehmendem Alter der Patienten schwerere Verläufe zeigt. Die Krankheit entsteht durch eine Infektion mit dem Mumpsvirus, das zu der Familie Paramyxoviridae gehört. Normalerweise werden Kinder im Alter zwischen 4 und 10 Jahren infiziert. Das Virus breitet sich über Tröpfcheninfektion oder direktem Kontakt mit dem Speichel des Patienten aus. Saisonell tritt das Virus am häufigsten im Winter und Frühjahr auf. Nach durchlaufener Infektion oder durch eine Impfung wird eine andauernde Immunität erreicht. Neben der Parotitis als Leitsymptom sind häufig auch andere Organe von der Krankheit betroffen, wie das ZNS und lymphatische Gewebe. Die Mumps-Meningitis ist eine häufige Manifestation der Erkrankung. Sie tritt nicht selten ohne Parotitis auf. Die Angaben über die Häufigkeit schwanken zwischen 1,4 % und 66 % der klinisch Erkrankten. In den meisten Fällen heilt sie komplikationslos aus. Die labor diagnostische Bestätigung des Mumps wird durch den Erregernachweis oder durch die Bestimmung erregerspezifischer Antikörper geführt. Die Serodiagnostik spielt hierbei die größere Rolle. Neben den klassischen Methoden wie KBR, HAH und NT stehen der Immunfluoreszenztest, der Hämolyse-in-Gel-Test, der Radioimmunoassay sowie der Enzymimmunoassay zur Verfügung. Eine Immunität kann über den IgG ELISA nachgewiesen werden. Da eine Kreuzreaktion mit dem Parainfluenza-Virus (Typ 2) zu falschen Ergebnissen führen kann, sind steigende IgG-Titer hilfreich bei der Feststellung des auslösenden Agens. Zu Beginn der Erkrankung liegen in der Regel hohe IgM-Titer vor. Der Vorteil der ELISA Methode beruht auf der Möglichkeit, die verschiedenen Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM getrennt nachzuweisen, womit eine eindeutige Zuordnung zu einer frischen oder einer abgelaufenen Infektion möglich wird.

3. TESTPRINZIP

Der Mumps-IgM-Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Mumps-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgM-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Mumps-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgM-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgM-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Symbol	Komponenten	Volumen / Menge
SORB MT	Mumps-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
CAL A	Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
CAL B	Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL C	Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
CAL D	Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
ENZ CONJ	Anti-human-IgM-Enzymkonjugat	15 mL
SUB TMB	Substratlösung	15 mL
STOP SOLN	Stopp-Lösung	15 mL
SAM DIL	Probenverdünner	60 mL
WASH SOLN 10x	Waschpuffer (10x)	60 mL
-	Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Mumps-Antigen (Stamm Enders (ATCC VR-106)). Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Mumps. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgM-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgM-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendekkel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,010	
Negativ-Kontrolle	0,017	0,007
Cut-Off Standard	0,419	0,409
schwach Positiv-Kontrolle	0,876	0,866
Positiv-Kontrolle	1,729	1,719

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden. Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Mumps IgM Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben. Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden. Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet. Bei fraglich IgM positiven Ergebnissen bzw. zur Absicherung einer positiven Reaktion sollte eine Rheumafaktor-Absorption mit einem geeigneten Reagenz (Best.-Nr. DEMJS02, RF-Adsorbent) vorgenommen werden.






10. TESTCHARAKTERISTIKA

Mumps ELISA	IgM
Intra-Assay-Präzision	8,7 %
Inter-Assay-Präzision	6,8 %
Inter-Lot-Präzision	4,2 – 9,5 %
Analytische Sensitivität	1,23 U/mL
Wiederfindung	121 – 128 %
Linearität	78 – 135 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen Masern und Varizella zoster
Interferenzen	Keine Interferenzen mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	75 %
Klinische Sensitivität	100 %

11. LITERATUR

1. Bayas JM et al.: Susceptibility to measles, rubella and parotitis in young adults. Med Clin (Barc) 1996 Apr 20; 106(15):561-4.
2. Chomel JJ et al.: Rapid direct diagnosis of mumps meningitis by ELISA capture technique. J Virol Methods 1997 Oct; 68(1):97-104.
3. Gut JP et al.: Symptomatic mumps virus reinfections. J Med Virol 1995 Jan; 45(1):17-23.
4. Johnson CE et al.: Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. Pediatr Infect Dis J 1996 Aug; 15(8): 687-92.
5. King SM et al.: Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant 1996 Apr; 17(4):633-6.
6. Matter L et al.: Age-stratified seroprevalence of measles, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. Eur J Epidemiol 1997 Jan; 13(1):61-6.
7. Pison Garces et al.: Immunity to measles, mumps and rubella in children vaccinated with triple viral vaccine. Aten Primaria 1995 Mar 15; 15(4):235-7.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts- kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits- datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Bordetella pertussis FHA IgA ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgA antibodies against Bordetella pertussis FHA in serum and plasma



DEBPT08



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	5
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION.....	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	11
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11. LITERATUR.....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Bordetella FHA IgA Antibody ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgA antibodies against Bordetella FHA in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Whooping cough is a disease of the respiratory tracts which is caused by Bordetella pertussis bacteria. It is transmitted by airborne infection. The gramnegative Coccobacillus produces a series of biologically active molecules. The different compounds appear either during the pathogenesis or during the process of immunization against pertussis and show different effects. A characterisation has been made for the pertussis toxin (pt), the filamentary haemagglutinine (fha) and different lipopolysaccharides (lps).

Pertussis shows a high rate of transmission (rates of infection of over 90 % have been found for non-vaccinated household members) and can cause severe diseases, especially for very young children. In older children and adults the disease may manifests itself by unspecific brochitic symptoms or inflammation of the upper respiratory tract. School children which are not totally immune may develop whooping cough and infect younger children easily. This applies also to infected adults. The development of antibodies towards Bordetella pertussis during a pertussis disease reveals itself by a relatively long serologically negative initial phase, followed by a rapid increase of at first IgA und IgM antibodies and lastly IgG. Of 259 sera derived from children and adults with suspected whooping cough 142 were confirmed positive by an ELISA. Due to the broad application of Bordetella vaccines a significant reduction of the incidence and fatal casualties caused by whooping cough were achieved. A precise method for the quantification of the antibody concentration against Bordetella pertussis in serum is required to assess the success of a pertussis vaccination, diagnose an infection and detect diaplacental transfer of maternal antibodies.

FHA is a 220 kDa sized surface antigen of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis which agglutinates erythrocytes in vitro. It is a component of numerous vaccines. For this reason a simple, fast, sensitive and according to an international reference preparation calibrated ELISA test kit for the detection of Bordetella FHA IgA antibodies was developed.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Bordetella FHA IgA antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Bordetella FHA antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgA antibodies of the serum and the immobilized Bordetella FHA antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgA peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgA antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Symbol		Components	Volume / Qty.
SORB	MT	Bordetella FHA antigen coated microtiter strips	12
CAL	A	Calibrator A (Negative Control)	2 mL
CAL	B	Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL	C	Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
CAL	D	Calibrator D (Positive Control)	2 mL
ENZ	CONJ	Enzyme Conjugate	15 mL
SUB	TMB	Substrate	15 mL
STOP	SOLN	Stop Solution	15 mL
SAM	DIL	Sample Diluent	60 mL
WASH	SOLN	Washing Buffer (10x)	60 mL

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Bordetella FHA antigen (strain Tohama). Ready-to-use.

5.2. Standards

4 x 2 mL, human serum diluted with PBS, with 0, 10, 25 and 50 IU/mL of IgA antibodies against Bordetella FHA. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. The ready-to-use Bordetella FHA standards are calibrated against the **WHO reference preparation 06/140**.

5.3. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgA-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L ProclinTM. Ready-to-use.

5.4. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.5. Stop Solution

15 mL, 0.5 M sulfuric acid. Ready-to-use.

5.6. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.7. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)
- Plastic Bag

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.020	
Standard 1 (0 IU/mL)	0.049	0.029
Standard 1 (10 IU/mL)	0.531	0.511
Standard 1 (25 IU/mL)	1.106	1.086
Standard 1 (50 IU/mL)	2.228	2.208

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Bordetella FHA IgA antibody kit are calibrated using the **WHO reference preparation 06/140**. As such they are expressed in International Units (IU). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

In recent publications the following age dependent reference ranges are recommended for Bordetella FHA IgA:

- <1 year: < 2 IU/mL
- 1-4 years: <2 IU/mL
- 5-10 years: <18 IU/mL
- ≥11 years: <42 IU/mL

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Bordetella FHA ELISA	IgA
Intra-Assay-Precision	6.0 – 12.6 %
Inter-Assay-Precision	8.1 – 17.1 %
Inter-Lot-Precision	7.2 – 11.2 %
Analytical Sensitivity	0.5 IU/mL
Recovery	86 – 113 %
Linearity	71 – 155 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Helicobacter, Transglutaminase and Mycoplasma.
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	100 %
Clinical Sensitivity	100 %
Measuring Range	10 – 50 IU/mL

11. REFERENCES

1. Chodorowska, M. et al. ELISA test used for serologic diagnosis of Pertussis. *Med. Dosw. Microbiol.*, **48**: 15 (1996).
2. Cherry et al.: The Epidemiology of Pertussis: A Comparison of the Epidemiology of the Disease Pertussis with the Epidemiology of Bordetella pertussis Infection. *Pediatrics* 115, 1422 (2005)
3. Finger, H. et al. Serological diagnosis of whooping cough. *Dev. Biol. Stand.*, **610**: 331 (1985).
4. Granström, G. et al. Specific Immunoglobulin A to bordetella pertussis antigen. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 869 (1988).
5. Kuno-Sakai, H. et al.: A simple and sensitive ELISA of antibodies to Pertussis antigens. *Vaccine* **10**: 350 (1992).
6. Nagel, J. et al.: Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **610**: 325 (1985).
7. Reizenstein, E. et al.: Comparison of five calculation modes for antibody ELISA against Pertussis. *J. Immunol. Methods* **183**: 279 (1995).
8. Sato, Y. et al.: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **73**: 167 (1991).
9. Steketee, R. W. et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis. *J. Infect. Dis.* **157**: 441 (1988).
10. Watanabe M. et al. : Characterization of serological responses to Pertussis ; *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (3), 314 (2006).
11. Riffelmann, M. et al.: Performance of commercial enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis, *J. Clin. Microbiol.* 48, 4459 (2010).
12. Wirsing von König, CH. et al.: Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children, *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 341 (1999).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Bordetella FHA IgA ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgA-Antikörpern gegen Bordetella Filamentöses Hämagglutinin (FHA) im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Keuchhusten ist eine Krankheit der Atemwege, die durch Bordetella pertussis Bakterien hervorgerufen und durch Tröpfcheninfektion übertragen wird. Der zugrundeliegende gramnegative Coccobacillus erzeugt eine Reihe von biologisch aktiven Verbindungen. Die verschiedenen Komponenten erscheinen entweder während der Pathogenese oder der Immunisierung gegen Pertussis und zeigen eine unterschiedliche Wirkung. Charakterisiert wurden in diesem Zusammenhang das Pertussis Toxin (PT), das filamentäre Hämagglutinin (FHA) sowie verschiedene Lipopolysaccharide (LPS).

Pertussis zeigt eine hohe Übertragungshäufigkeit (es wurden Infektionsraten von über 90 % bei nicht-geimpften Haushaltsangehörigen gefunden) und kann eine ernsthafte Erkrankung besonders bei sehr jungen Kindern hervorrufen. Bei älteren Kindern und Erwachsenen (einschließlich bereits geimpfter Personen) kann sich die Infektion durch eine unspezifische Bronchitissymptomatik oder eine Entzündung der oberen Atemwege manifestieren. Schulkinder, die nicht völlig immunisiert sind und Pertussis entwickeln, können leicht jüngere Kinder anstecken. Dies gilt auch für den infizierten Erwachsenen. Die Entwicklung der Antikörper gegen Bordetella pertussis während einer Keuchhustenerkrankung zeigt eine relativ lange serologisch negative Vorphase, gefolgt von einem schnellen Anstieg von zuerst IgA und IgM Antikörpern, zum Schluss erscheint IgG. In 259 Seren von Kindern und Erwachsenen mit Verdacht auf Keuchhusten wurden mit einem ELISA 142 positive Fälle gefunden. Durch die breite Anwendung von Bordetella-Impfstoffen wurde eine deutliche Verminderung der Inzidenz und der Todesfälle bei Keuchhusten erreicht. Eine genaue Methode zur Quantifizierung der Antikörperspiegel im Serum gegen Bordetella pertussis ist erforderlich, um die Wirkung der Pertussis-Impfung zu ermessen, Infektionen zu diagnostizieren und transplazentär übertragene mütterliche Antikörper zu entdecken.

Bei FHA handelt es sich um ein 220 kDa großes Oberflächenantigen von Bordetella pertussis und Bordetella parapertussis, das in vitro Erythrocyten agglutiniert. FHA ist Bestandteil zahlreicher Impfstoffe. Aus diesem Grunde wurde ein einfacher, schneller, empfindlicher und nach einer internationalen Referenzpräparation standardisierter ELISA-Test zum Nachweis von Bordetella FHA IgA-Antikörpern entwickelt.

3. TESTPRINZIP

Der Bordetella FHA IgA Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Bordetella FHA-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgA-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Bordetella FHA-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgA-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgA-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 – 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Symbol		Komponenten	Volumen / Menge
SORB	MT	Bordetella FHA-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
CAL	A	Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
CAL	B	Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
CAL	C	Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
CAL	D	Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
ENZ	CONJ	Anti-human-IgA-Enzymkonjugat	15 mL
SUB	TMB	Substratlösung	15 mL
STOP	SOLN	Stopp-Lösung	15 mL
SAM	DIL	Probenverdünner	60 mL
WASH	SOLN 10x	Waschpuffer (10x)	60 mL

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Bordetella FHA-Antigen (Stamm To-hama). Gebrauchsfertig.

5.2. Standards

0, 10, 25, 50 IU/mL; je 2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält IgA Antikörper gegen Bordetella FHA. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Die gebrauchsfertigen Bordetella FHA-Standards sind auf Internationale Units (IU) eingestellt und gegen das **WHO Referenzpräparat 06/140** kalibriert worden.

5.3. Anti-human-IgA-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgA-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.4. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.5. Stopp-Lösung

15 mL, 0,5 M Schwefelsäure. Gebrauchsfertig.

5.6. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.7. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)
- Plastikbeutel

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,020	
Standard 1 (0 IU/mL)	0,049	0,029
Standard 2 (10 IU/mL)	0,531	0,511
Standard 3 (25 IU/mL)	1,106	1,086
Standard 4 (50 IU/mL)	2,228	2,208

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Bordetella FHA IgA Antikörper-Kits sind auf Internationale Units (IU) eingestellt und gegen das **WHO Referenzpräparat 06/140** kalibriert worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

In aktuellen Publikationen werden die folgenden altersabhängigen Normalbereiche für Bordetella FHA IgA empfohlen:

- <1 Jahr: < 2 IU/mL
- 1-4 Jahre: <2 IU/mL
- 5-10 Jahre: <18 IU/mL
- ab 11 Jahre: <42 IU/mL












10. TESTCHARAKTERISTIKA

Bordetella FHA ELISA	IgA
Intra-Assay-Präzision	6,0 – 12,6 %
Inter-Assay-Präzision	8,1 – 17,1 %
Inter-Lot-Präzision	7,2 – 11,2 %
Analytische Sensitivität	0,5 IU/mL
Wiederfindung	86 – 113 %
Linearität	71 – 155 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität auf Helicobacter, Transglutaminase und Mycoplasma.
Interferenzen	Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL.
Klinische Spezifität	100 %
Klinische Sensitivität	100 %
Messbereich	10 – 50 IU/mL

11. LITERATUR

1. Chodorowska, M. et al. ELISA test used for serologic diagnosis of Pertussis. *Med. Dosw. Microbiol.*, **48**: 15 (1996).
2. Cherry et al.: The Epidemiology of Pertussis: A Comparison of the Epidemiology of the Disease Pertussis with the Epidemiology of Bordetella pertussis Infection. *Pediatrics* 115, 1422 (2005)
3. Finger, H. et al. Serological diagnosis of whooping cough. *Dev. Biol. Stand.*, **610**: 331 (1985).
4. Granström, G. et al. Specific Immunoglobulin A to bordetella pertussis antigen. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 869 (1988).
5. Kuno-Sakai, H. et al.: A simple and sensitive ELISA of antibodies to Pertussis antigens. *Vaccine* **10**: 350 (1992).
6. Nagel, J. et al.: Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **610**: 325 (1985).
7. Reizenstein, E. et al.: Comparison of five calculation modes for antibody ELISA against Pertussis. *J. Immunol. Methods* **183**: 279 (1995).
8. Sato, Y. et al.: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis. *Dev. Biol. Stand.* **73**: 167 (1991).
9. Steketee, R. W. et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis. *J. Infect. Dis.* **157**: 441 (1988).
10. Watanabe M. et al. : Characterization of serological responses to Pertussis ; *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (3), 314 (2006).
11. Riffelmann, M. et al.: Performance of commercial enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis, *J. Clin. Microbiol.* 48, 4459 (2010).
12. Wirsing von König, CH. et al.: Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children, *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 341 (1999).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konfirmitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore