



VIR-ELISA ANTI – BORRELIA - IgG/ -IgM



1. INTENDED USE

Enzyme-immunoassay for determination of antibodies against *Borrelia burgdorferi* (Lyme) in human serum and plasma

IgG REF EG 111 ▽ 96 IVD
 IgM REF EM 111 ▽ 96 IVD

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The detection of antibodies is based on the principle of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The purified, homogeneous antigen is fixed to each well of the microtiterstrips. Any specific antibodies present in the patient's sample are bound during the first incubation. After removing unbound material by washing, the presence of specific antibodies is detected using Anti-human IgG/ IgM conjugate during the second incubation. Excess peroxidase conjugate is then removed and TMB substrate is added, resulting in the development of a blue colour. The enzyme reaction is terminated by the addition of a stop solution. The intensity of the yellow colour thus developed is proportional to the concentration of antibodies in the sample.

3. DIAGNOSTIC RELEVANCE AND INTERPRETATION OF RESULTS

To obtain a final diagnosis the patient history and clinical symptoms should be included for the interpretation of the serological results and possible cross-reactivity should be taken into consideration.

IgG	IgM	Interpretation	Recommendation
-	-	no specific antibodies detectable	By suspect of acute infection – control tests are recommended
+	-	possible previous infect or recent reinfection	Monitoring of IgG antibodies (Sample collection within 10 to 14 days), a significant titre increase in the absence of IgM antibodies indicates a reinfection.
-	+	primary infection probable	Monitoring of IgG and IgM antibodies to determine seroconversion; confirmatory tests e.g. IFA, Immunoblot
+	+	acute infection probable	Monitoring of IgG and IgM titres; confirmatory tests e.g. IFA

- negative, + positive

4. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity / Sensitivity

62 samples IgG/ 65 samples IgM were tested parallel in VIR-ELISA ANTI-BORRELIA -IgG/ -IgM and comparison methods (ELISA). The specificity and sensitivity are based on the results found.

Specificity: IgG 96,4% **Sensitivity:** IgG 100%
Specificity: IgM 94,3% **Sensitivity:** IgM 90%

For the calculation of the specificity and sensitivity of the ELISA test, equivocal results were defined as positive results. The results refer to the groups of samples investigated.

Precision and reproducibility

Intra-assay reproducibility was determined by testing samples of different levels of antibody reactivity for at least 22 times in one test run. The coefficient of variation (CV) of the reactive IgG and IgM samples was < 10%.

Inter-assay reproducibility was determined by testing samples of different levels of antibody reactivity in 10 different test runs. The CV of the reactive IgG and IgM samples was < 10%.

Cross-reactivity

Cross-reactivity with Spirochaetes, particularly *T. pallidum*, can result in false positive results with ELISA. Clarification of the antibody response with a Lues specific test (e.g. TPHA and FTA-ABS) or a Western Blot is advisable. Possible cross-reactivity may be avoided by using a spirochaete absorbent prior to testing. Fresh EBV infections may also give rise to a false positive *Borrelia* IgM titre. Thus an isolated positive IgM result should be checked against an EBV test.

5. Bib

- Karlsson, M. J. Clin. Microbiol., 28 (5), 2148-2150
- Putzker, M.; Zöller, L. Clin. Lab. 41 (9) 655-666 (1995)

6. KIT COMPONENTS

- MICROTITERSTRIPS** MTS
One microtiterplate is supplied which contains 12 microtiterstrips of 8 breakapart wells. The wells are coated with purified, inactive antigen. Strips are colour-coded.
- PEROXIDASE CONJUGATE** CONJPOD
One vial containing 12 ml of ready-to-use sheep anti-human IgG or IgM Peroxidase Conjugate. Peroxidase conjugate contains 0.049% Thimerosal as preservative.
- NEGATIVE CONTROL** CONTROL-
One vial of 1.2 ml containing human serum with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use.
- CUT OFF CONTROL** CUTOFF
One vial of 1.2 ml containing human serum with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use.
- POSITIVE CONTROL** CONTROL+
One vial of 1.2 ml containing human serum with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use. The titre is reported on the label.
- TMB SUBSTRATE** SUBS/TMB
One vial containing 13 ml of ready-to-use tetra-methylbenzidine (TMB) substrate.
- SAMPLE DILUENT** SPE/DIL
One bottle containing 100 ml (2x50 ml) of ready-to-use sample diluent buffer. The buffer includes 0.05% microbial preservative.
- WASH SOLUTION 25X** WASH/BUF25x
One bottle containing 80 ml (2x40 ml) of wash solution concentrate.
- STOP SOLUTION** SOLN/STOP
One bottle containing 15 ml of 0.95N H₂SO₄ stop solution. Ready-to-use.

The safety data sheet (MSDS) is available upon request.

7. STORAGE AND STABILITY

Store all reagents at 2-8°C. Protect them from intense light and do not freeze. The expiration date of each component is indicated on the respective vial label. Do not use reagents beyond the expiration date. After opening, MTS must be stored at 2-8°C in the plastic bag with desiccant and are stable up to 4 weeks. The diluted WASHBUF is stable up to 4 weeks when stored at 2-8°C. Use only MTS with an intact vacuum packaging.

8. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Test tubes for sample dilution
- Timer
- Micropipettes, multipipettes 10-1000 µl
- One-liter graduated cylinder, distilled water
- ELISA washer or multichannel pipette
- Spectrophotometer for micro-plates (450 nm/ reference wavelength 630/620 nm)
- Paper towels, pipette tips

9. WARNINGS OR PRECAUTIONS SAFETY PRECAUTIONS

The ELISA test is for **IVD** use only.

- Do not mix lot specific reagents, such as **MTS**, controls and **CONJPOD** from different kit lots. The **SUBS/TMB** doesn't have to be from the original test kit, but the lot of the **SUBS/TMB** has to be the same as indicated on the kit label. The **SPE/DIL** (except Immunocapture assays), the **WASHBUF/25x** and the **SOLN/STOP** can be used for all ELISA tests.
- Seal all bottles properly after use in order to avoid bacterial contamination. All samples and kit components should be considered potentially infectious. All control samples have been tested for Hepatitis Bs antigen, anti-HIV I and II, anti-HCV (CE/FDA) and found to be negative.
- The **MTS** are coated with inactive antigen. However, normal laboratory precautions should be maintained when handling with infectious material. Do not pipette by mouth.
- Avoid contact with skin and mucous membranes when handling reagents, which contain preservatives (see kit contents). Wash thoroughly with water in case of contact and possibly look up a doctor.
- Controls containing sodium azide may react with lead and copper plumbing, building up explosive metal acids. Flush with sufficient water when disposing of reagents.
- The **SOLN/STOP** (0,95 N H₂SO₄) contains sodium hydroxide which may irritate skin and mucous membranes. Wash thoroughly with water in case of contact.
- For disposal the legal regulations have to be followed.

10. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Only qualified and well-trained employees should carry out the assay procedure.
- The instruction for use describes the applicable test method. In case of modification or applications others than the intended use, or the use of automatic processors, the user has to validate the procedure and take the responsibility for it.
- Microbially contaminated specimen may cause interference.
- Lipaemic, hemolytic or icteric samples should only be tested with reservations although in our testing no negative influence has been found.
- Suitable specimens are serum or plasma (heparinized, EDTA) samples obtained by standard laboratory techniques.
- The samples should not be heat-inactivated since non-specific results may occur.
- Results on tests using CSF are not available.
- Patient samples should be stored at \pm 2-8°C.
For long term storage \pm -20°C or lower is recommended.
Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- Note:** Diluted patient samples must be used on the same day.

11. ASSAY PROCEDURE REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature prior to use !

WASHBUF : Dilute the **WASHBUF/25x** 1:25 with distilled water
e.g. add 40ml of **WASHBUF/25x** to 960 ml distilled water and mix well.

Dilution of samples: Dilute patient samples **1:101** with **SPE/DIL** e.g.
10µl sample + 1ml **SPE/DIL**; mix thoroughly.

In case of pretreatment of the samples with RF Absorbent, the final dilution of 1:101 must be considered. Please follow the instruction for use of the RF Absorbent used in the test.

Controls are ready to use.

Note: To take into consideration pipetting time, it is recommended that the **CUTOFF** is repeated after every 4 **MTS** (resp. after a pipetting time of \geq 5 min.) to evaluate the following patient's tests with the new calculated cut-off value. In case of a semiquantitative determination the **CONTROL+** should also be repeated the same way the **CUTOFF** was dispensed.

Take the required **MTS** out of the foil packets and place them in the holder. Possibly remaining wells of a **MTS** have to be stored at 2-8°C tightly sealed in the plastic bag provided, with the desiccant inside.

12. PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- Pipette 100µl of the controls or diluted patient sample into the wells. Pipette 100 µl of sample diluent into well A1 (Blank).
- Incubate the wells at room temperature (18...25°C) for 30 minutes, protected from intense light.
- Wash the wells four times as described in section **k. WASHING PROCEDURE**
- Add 100µl of ready-to-use peroxidase conjugate to each well.
- Incubate the wells at room temperature (18...25°C) for 30 minutes, protected from intense light.
- Repeat washing as in section C above.
- Add 100µl of ready-to-use TMB substrate to each well.
- Incubate the wells at room temperature (18...25°C), in the dark for 10 minutes
- Add 100µl of stop solution to each well. Tap gently to ensure homogenous color distribution and read within 10 minutes.
- To read the plate, make sure that the bottom is free from moisture and that no air bubbles are in the wells. Read the absorbance of the well contents at 450nm on a suitable plate reader. On readers equipped with a dual wavelength facility set the reference filter to 620/630 nm.

Attention: The absorbance (OD) of the Blank must be always subtracted from the OD values of the controls and samples.

PROCEDURAL NOTES

Do not allow the wells to dry out between incubations.
Comply with the given incubation temperatures and times.

k. WASHING PROCEDURE

The washing procedure can be done manually with a multichannel pipette or on an automatic plate washer. Empty the wells, invert and tap dry on paper towel. Wash four times with a soaking time of approx. 30 seconds (300 µl).

13. SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

In case that the ELISA instructions are followed strictly, the reagents are handled with care and the samples and reagents are pipetted carefully, the following kinds of errors can be avoided to a large extend.

ERROR	POSSIBLE CAUSES
No colourimetric reaction after addition of Peroxidase conjugate (possibly with control sera during pipetting) may cause an inactivation.	No Peroxidase conjugate pipetted, contamination of Peroxidase conjugate (possibly with control sera during pipetting) may cause an inactivation.
Generally too high reaction	Incorrect Peroxidase conjugate (i.e. not from original test kit), incubation time too long or incubation temperature too high, water quality for Washing Solution insufficient (low grade of deionization)
Generally too weak reaction	Incorrect Peroxidase conjugate (i.e. not from original test kit), incubation time too short, incubation temperature too low
Reagent blank too high	Incorrect pipetting of sample diluent, contaminated reagents, reagents expired, exceeding of incubation time and temperature, external contamination of the bottom of microtiterstrips, (clean carefully!)
False positive / negative samples	Incorrect dilution of samples, microbially contaminated specimen
Unexplainable outliers	Contamination of pipettes, tips or containers or with metals (iron, copper etc.), insufficient washing
High variation (within a series)	Reagents (including microtiterstrips) not pre-warmed to room temperature prior to use. Washer is not washing correctly!
High variation (from series to series)	Incubation conditions not constant (time, temperature) high variation of incubation temperature, controls and samples are not carried out at same time (same intervals) check pipetting order, person related variation, strips dried out after washing (unreproducible results)

14. VALIDITY OF THE ASSAY

All controls should be carried out with every test run.

The test must comply with the following validation criteria:

- OD-value of Negative Control should be < 0.100 ,
- OD-value of Cut-off Control should be > 0.200 ,
- Ratio of Positive Control/ Cut-off value should be ≥ 1.5
- OD-value of the Blank should not be higher than 0.100 .

If controls give invalid levels then results from the test samples are invalid too and retesting is required.

15. CALCULATION OF RESULTS

A QUALITATIVE CALCULATION

Calculation of "Cut-off Value"

The **Cut-off value** is calculated from the absorbance of the Negative Control and the absorbance of the Cut-off Control and defines the Cut-off range.

$$\text{Cut-off Value} = \text{OD of the Negative Control} + \text{OD of the Cut-off Control}$$

$$\text{CUT-OFF RANGE} = \text{CUT-OFF VALUE} \pm 10\%$$

Interpretation of sample results:

RESULT	DEFINITION
negative -	OD value sample $<$ Cut-off value -10%
equivocal	OD value sample \geq Cut-off value -10% OD value sample \leq Cut-off value +10%
positive +	OD value sample $>$ Cut-off value +10%

Equivocal results should be retested. Following the confirmation of the equivocal result the monitoring of the patient's antibodies is recommended in order to exclude unspecific reactions resp. cross-reactivity, which may also cause equivocal results.

Note for IgM assay: In case of a positive or equivocal IgM antibody detection these samples should be confirmed with VIRO- IgG RF-Sorbent (Cod. VSB 100).

B CALCULATION OF RATIO (CUTOFF INDEX, COI):

Patient samples may also be quantified and interpreted by means of the calculation of the ratio (Cutoff Index, COI):

$$\text{COI} = \text{OD value of sample} / \text{Cut-off value},$$

whereby a ratio of 1.000 is equivalent to the Cut-off value.

Interpretation of sample results:

- Ratio $< 0,9$** negative result
Ratio $0,9-1,1$ equivocal result
Ratio $> 1,1$ positive result

C SEMI-QUANTITATIVE TITRE CALCULATION

A semi-quantitative diagram is enclosed. The first point on the curve is obtained from the **Cut-off value** (y-axis) and the cut-off titre 1:100 (x-axis). The second point of the curve is obtained from the absorbance of the **CONTROL+** (y-axis) and their titre (x-axis) as indicated on the label. Drawing a straight line between the two points produces the semi-quantitative curve. The titre of the patient samples may be read from the curve. The graph is linear up to the titre of the **CONTROL+**.







Samples with titres higher than the titre of the **CONTROL+**, should be diluted further with **SPE|DIL** according to the expected titre.
For calculation of results, the dilution factor should be taken into consideration.

The calculated titres of the patient samples may also be indicated as VU (VIRO-Units), e.g. a titre of 1:250 is equivalent to 250 VU.

Regarding diagnostic relevance and interpretation of results see **page 1**.

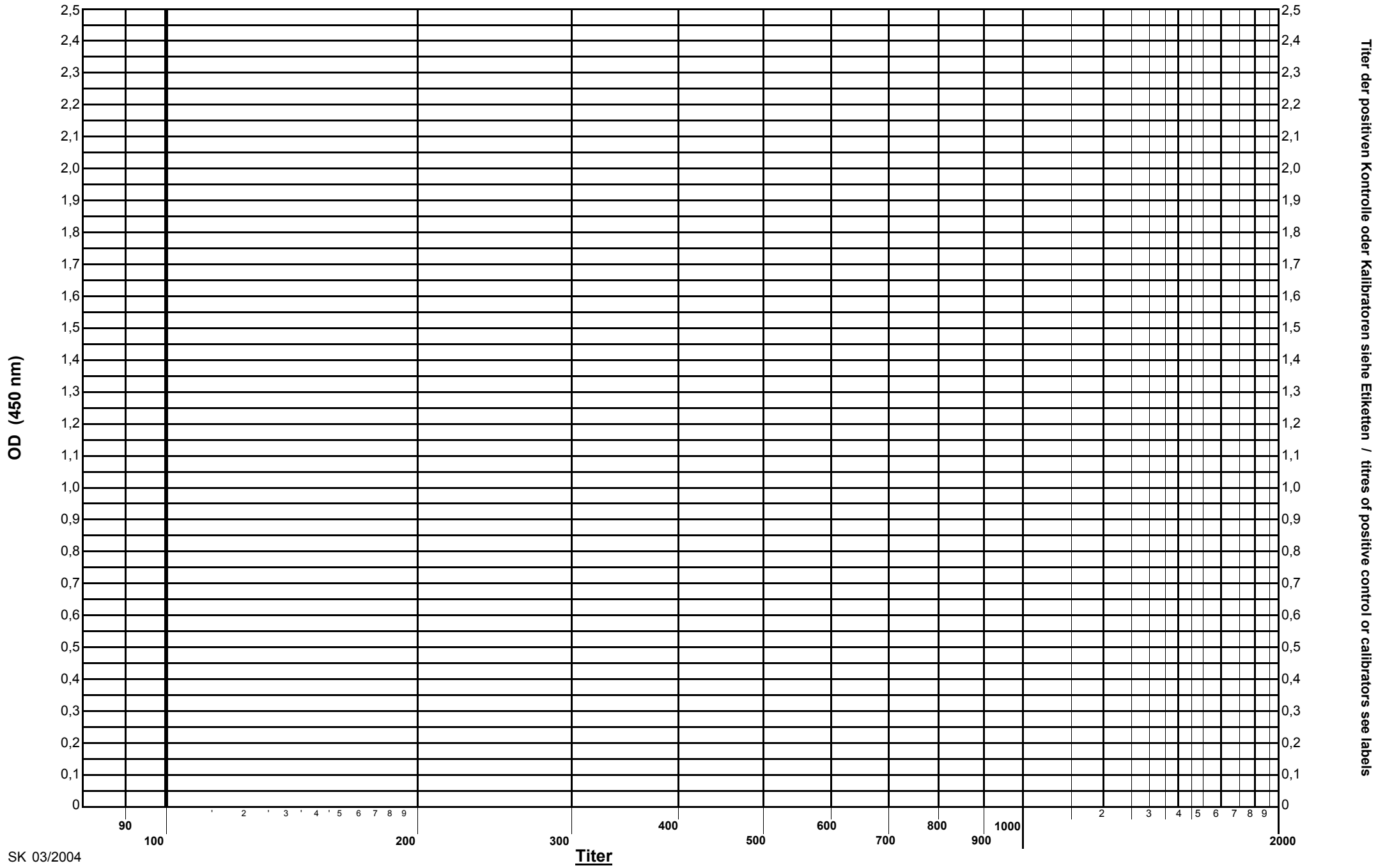
For further information please visit our website:
<http://www.viro-immun.de/>

Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole / Símbolos/ Simboli/ Simbolos/ Symboly/ Címkék/ Συμβολα IVD

MTS	Mikrotiterstreifen/ microtiterstrips/ Microplaques sensibilisées/ placa de microtítulo/ piasta microtitolo/ placa do microtítire/ Mikrotitračni Stripy/ Mikrotitersíkok/ Ταινίες μικροπιλοποίησης
SPE DIL	Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Redidlo na Vzorek/ Mintahigitó/ Αραιωτικό Δείγματος
WASHBUF 25x	Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promývací Roztok 25x/ Mosópufferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x
CONJ POD	Peroxidase-Konjugat / Peroxidase conjugate / Conjugue Peroxidase/Conjugado Peroxidasa / coniugato con perossidasi/ conjugado Peroxidase/ Konjugát Peroxidáza/ Peroxidáz Konjugátum/ Συζευγμένη υπεροξειδωση
CONTROL-	Negative Kontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ control negativo/ controllo negativo/ controle negativo / Negatívni Kontrola/ Negatív Kontroll/ αρνητικός Μάρτυρας
CUTOFF	Cut-off Kontrolle/ cut-off control/ Contrôle cut-off/ control valor límite/ controllo limitante/ controle interrupção/ cut off kontrola/ cut off kontroll/ μάρτυρας αποκοπής
CONTROL+	Positive Kontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ control positivo/ controllo positivo/ controle positivo/ pozitívni kontrola/ pozitív kontroll/ θετικός μάρτυρας
SUBS TMB	TMB-Substrat/ TMB substrate/ substrat TMB/ substrato TMB / Substrát TMB/ TMB Szubsztrát/ Υπόστρωμα TMB
SOLN STOP	Stopplösung/ stop solution/ Solution d'arrêt/ solución de parada/ soluzione d'arresto/ solução de parada/ Stop Činidlo/ Stop Oldat/ Διάλυμα Τερματισμού
Bib	Literatur/ Literature/ Littérature/ Bibliografia/ Bibliografia/ Literatura/ Irodalom/ Βιβλιογραφία
LOT	Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote/ Číslo Šarže/ Lot Szám/ Αριθμός παρτίδας
IVD	In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro Diagnostický Zdravotnický Prostředek/ In Vitro Diagnosztikum/ Διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro
REF	Artikel Nr./ reference or order number/ Référence ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commissione/ referência ou número de encomenda/ Katalogové Číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Κωδικός Καταλόγου
	96 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes / Počet Testů/ Vizsgálatok Száma/ Αριθμός εξετάσεων
	Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruções de uso/ Přečtěte si Návod k Použití/ Olvassa el a Használati Utasítást/ Δείτε Οδηγίες Χρήσεως
	Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/ Teplotní Omezení/ Hőmérsékleti Korlátozások/ Θερμοκρασιακά όρια
	Verfallsdatum:/ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di scadenza/ Limite de validade/ Datum Expirace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)
	Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ Výrobce/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...
	Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH , In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12 email: info@viro-immun.de



ELISA-Test
(Semi-)Quantitatives Auswertungsdiagramm * (semi-)quantitative evaluation diagram





VIR-ELISA ANTI – BORRELIA - IgG/ -IgM



1. VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay für die Bestimmung von Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi (Lyme) in humanem Serum und Plasma.

IgG REF EG 111 ▽ 96 IVD
 IgM REF EM 111 ▽ 96 IVD

2. TESTPRINZIP

Der Nachweis der Antikörper basiert auf dem Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die Mikrotiterstreifen sind mit gereinigtem, homogenisiertem, inaktiviertem Antigen beschichtet. In der Untersuchungsprobe des Patienten vorhandene spezifische Antikörper werden an das Antigen gebunden. Nach sorgfältigem Waschvorgang, bei dem alle nicht gebundenen Probenbestandteile entfernt werden, wird Anti-human IgG, IgM Peroxidase-Konjugat pipettiert, das sich an die bereits gebundenen Antikörper anlagert. Im Waschprozess wird überschüssiges Peroxidase Konjugat entfernt. Nach der Inkubation mit TMB-Substrat entsteht eine photometrisch messbare Enzym/Substratreaktion (blaue Färbung), die durch Zugabe von Stopplösung (Farbumschlag zu gelber Färbung), gestoppt wird. Der gemessene Extinktionswert ist proportional der spezifischen Antikörperkonzentration in der Probe.

3. DIAGNOSTISCHE RELEVANZ UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Für eine endgültige Diagnose sollten die Patientenanamnese und die klinischen Symptome in die Interpretation der serologischen Ergebnisse eingeschlossen werden; mögliche Kreuzreaktionen sollten in Erwägung gezogen werden.

IgG	IgM	Interpretation	Empfehlung
-	-	Keine spezifischen Ak nachweisbar	Bei Verdacht auf eine akute Infektion werden Kontrolluntersuchungen empfohlen.
+	-	Wahrscheinlich zurückliegende Infektion oder Reinfektion	Verlaufskontrolle der IgG-Ak (Proben im Abstand von 10-14 Tagen erneut testen): signifikanter Titeranstieg bei fehlenden IgM-Ak läßt auf eine Reinfektion schließen.
-	+	Erstinfektion wahrscheinlich	Verlaufskontrolle der IgG- und IgM- Ak Serokonversion aufzeigen; Bestätigungsteste z.B. IFA, Immunoblot.
+	+	Akute Infektion wahrscheinlich	Verlaufskontrolle: signifikanter Titeranstieg IgG-Ak aufzeigen; Bestätigungsteste z.B. IFA

- negativ, + positiv

4. TESTCHARACTERISTIKA

Spezifität / Sensitivität

Es wurden 62 Proben IgG/ 65 IgM parallel im VIR-ELISA ANTI- BORRELIA -IgG/ -IgM und in Vergleichsmethoden (ELISA/IFA) getestet. Die Angaben zur Spezifität und Sensitivität des VIR-ELISA beziehen sich auf die gefundenen Testergebnisse.

Spezifität: IgG 96,4% **Sensitivität:** IgG 100%
Spezifität: IgM 94,3% **Sensitivität:** IgM 90%

Grenzwertige Proben wurden bei der Berechnung grundsätzlich als positiv bewertet. Die Berechnungen zur Bestimmung der Spezifität und Sensitivität beziehen sich nur auf die untersuchten Probenkollektive.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die intraserielle Präzision (Intraassay) wurde mittels unterschiedlich reaktiver Proben im Mehrfachansatz (n=22) innerhalb einer antigenbeschichteten Platte berechnet. Die ermittelten Variations-Koeffizienten (VK) der reaktiven Proben im IgG und IgM Test betragen < 10 %.

Für die Bestimmung der interseriellen Reproduzierbarkeit (Interassay) wurden unterschiedlich reaktive Proben in 10 unabhängig voneinander durchgeführten Testläufen angesetzt. Die ermittelten Variations-Koeffizienten (VK) der reaktiven Proben im IgG und IgM Test betragen < 10 %.

Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen mit Spirochaeten, z.B. mit T. pallidum können zu falsch positiven Ergebnissen im ELISA führen. Abklärung der Antikörperantwort mit einem Lues-spezifischen Test (z.B. TPHA / FTA-Abs) oder Western-Blot ist ratsam. Eine vorherige Absorption der Proben mit Reiterspirochaeten-Absorbent kann ebenfalls mögliche Kreuzreaktionen vermeiden. Frische EBV-Infektionen können einen falsch positiven Borrelia-IgM-Titer bewirken. Ein isoliert positiver IgM-Test sollte durch einen EBV-Test überprüft werden.

5. Bib

- Karlsson, M. J. Clin. Microbiol., 28 (5), 2148-2150
- Putzker, M.; Zöller, L. Clin. Lab. 41 (9) 655-666 (1995)

6. KITKOMPONENTEN

1. MIKROTITERSTREIFEN MTS

Eine Mikrotiterplatte mit 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 einzeln brechbaren Wells. Die Wells sind mit gereinigtem, inaktivem Antigen beschichtet. Die Streifen sind farbmarkiert.

2. PEROXIDASE KONJUGAT CONJ|POD

Ein Fläschchen (12 ml) Anti-human-IgG oder IgM-Peroxidase-Konjugat (Schaf) mit 0,049 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig

3. NEGATIVE KONTROLLE CONTROL-

Ein Fläschchen (1,2 ml), Humanserum, mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

4. CUT OFF KONTROLLE CUTOFF

Ein Fläschchen (1,2 ml) Humanserum, mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

5. POSITIVE KONTROLLE CONTROL+

Ein Fläschchen (1,2 ml) Humanserum, mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. Der Titer ist auf dem Fläschchenetikett angegeben.

6. TMB SUBSTRATLÖSUNG SUBS|TMB

Ein Fläschchen (13 ml) Tetra-Methylbenzidin-Substrat (TMB). Gebrauchsfertig.

7. PROBENVERDÜNNUNGSPUFFER SPEDIL

Ein Fläschchen (100 ml) (2x50 ml) Probenverdünnungspuffer mit 0,05 % antimikrobiellem Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

8. WASCHLÖSUNG 25X WASHBUF|25x

Ein Fläschchen (80 ml) oder (2x40 ml) Waschlösungskonzentrat.

9. STOPPLÖSUNG SOLN|STOP

Ein Fläschchen (15 ml) mit 0,95 N H₂SO₄ Stopplösung. Gebrauchsfertig.

Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

7. LAGERUNG UND STABILITÄT

Alle Reagenzien sind bei \pm 2-8°C zu lagern. Reagenzien nicht einfrieren sowie vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Die Haltbarkeit der Reagenzien ist auf den Etiketten angegeben, nach Verfallsdatum sind diese nicht mehr zu verwenden. Nach Öffnung sind die MTS bei \pm 2-8°C in Gegenwart von Trockenmittel zu lagern und bis zu 4 Wochen haltbar. Die Gebrauchsverdünnung des WASHBUF ist bis zu 4 Wochen bei \pm 2-8°C haltbar. Nur MTS mit intakter Vakuumverpackung verwenden.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Röhrchen für die Probenverdünnung
- Stoppuhr
- Mikropipetten, Multipipette 10 – 1000 µl
- Messzylinder für 1 L
- Aqua dest.
- ELISA -Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten:
Wellenlänge 450 nm/Referenzwellenlänge 630/620nm
- Saugfähiges Papier, Einwegspitzen

9. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN SICHERHEITSHINWEISE

Der Test ist ausschließlich für **[IVD]** hergestellt.

- Chargenspezifische Reagenzien wie **[MTS]**, Kontrollen und **[CONJPOD]** aus Kits unterschiedlicher Chargen nicht austauschen. **[SUBS/TMB]** muss chargenspezifisch, nicht aber kitspezifisch verwendet werden. **[SPE/DIL]** (außer Immunocaptureassays), **[WASHBUF/25x]** und **[SOLN/STOP]** können bei allen ELISA Testen chargen- und kitunabhängig verwendet werden.
- Alle Fläschchen nach Gebrauch gut verschließen, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden. Alle Patientenproben und Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Kontrollen wurden auf HBs-Ag, HCV- und HIV I und II -Ak (CE/FDA) getestet und für negativ befunden.
- Die **[MTS]** sind mit inaktiviertem Antigen beschichtet. Jedoch sollte auch hier auf die im Labor übliche Sorgfalt für das Arbeiten mit infektiösem Material geachtet werden. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Einige Reagenzien (siehe Kitinhalt) enthalten Konservierungsmittel. Der Kontakt mit Haut und Schleimhaut ist zu vermeiden. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Das in den Kontrollen enthaltene Natriumazid bildet bei Kontakt mit Blei- und/oder Kupferrohren explosive Metallazide, deshalb sollte bei deren Beseitigung mit reichlich Wasser nachgespült werden. S-Sätze: 26.1, 28.1 und S-46. Gefahrenhinweis: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. **Arzt** aufsuchen.
- Die **[SOLN/STOP]** (0,95 N H₂SO₄) ist eine ätzende Flüssigkeit. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser und Seife abwaschen.
- Zur Entsorgung sind die gesetzlichen Regelungen zu beachten.

10. PROBENGEWINNUNG- UND LAGERUNG

- Die Testdurchführung muss durch ausgebildetes Fachpersonal erfolgen.
- Die Gebrauchsanweisung enthält die Angabe über die Testmethode. Eine Modifikation oder andere Anwendung sowie die Anwendung von automatischen Prozessoren müssen vom Anwender validiert werden und liegen in dessen Verantwortung.
- Bakteriell verunreinigte Proben können zu unzuverlässigen Testergebnissen führen.
- Lipämische, hämolytische sowie ikterische Proben (Serum oder Plasma) sollten nur unter Vorbehalt eingesetzt werden, obwohl in unseren Untersuchungen kein negativer Einfluss festgestellt wurde.
- Serum- oder Plasma- (Heparin, EDTA) proben, die nach Standard-Labortechniken entnommen sind, sind zur Untersuchung geeignet.
- Hitzebehandelte Proben dürfen nicht verwendet werden.
- Ergebnisse zur Untersuchung von Liquorproben liegen nicht vor.
- Kurzfristige Lagerung der Proben bei $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$, eine längerfristige Lagerung wird bei $\pm 20^{\circ}\text{C}$ empfohlen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.
- Hinweis:** In **[SPE/DIL]** verdünnte Proben müssen am gleichen Tag im Test eingesetzt werden.

11. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

[WASHBUF]: Das Konzentrat 1:25 mit aqua dest. verdünnen
z.B. 40 ml **[WASHBUF/25x]** + 960 ml aqua dest. Waschlösung gut mischen!

Probenverdünnung: Alle Untersuchungsproben **1:101** mit **[SPE/DIL]** im Röhrchen verdünnen. z.B. 10 µl Probe + 1 ml **[SPE/DIL]**. Die Verdünnung gut mischen!

Bei der Vorbehandlung der Proben mit RF-Absorbent, muss die Endverdünnung von 1:101 berücksichtigt werden. Bitte die Gebrauchsanweisung des im Test eingesetzten RF-Sorbent beachten.

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig !

Hinweis: Unter Berücksichtigung der Pipettierzeit **wird empfohlen** die **[CUTOFF]** nach jedem vierten **[MTS]** (oder bei einer Pipettierzeit ≥ 5 min.) erneut anzusetzen, um die nachfolgenden Patientenproben mit dem aktuellen Cut-off-Wert auswerten zu können. Bei einer semiquantitativen Auswertung (Titerbestimmung) der Patientenproben sollte zusätzlich die **[CONTROL+]** nach jedem vierten **[MTS]** erneut angesetzt werden.

Benötigte Anzahl **[MTS]** den Folienverpackungen entnehmen und in den Halterahmen einsetzen. Nicht benötigte **[MTS]** in den mit Trockenmittel versehenen Plastikbeutel geben, gut verschließen und bei $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$ lagern.

12. PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

- 100 µl der Kontrollen und verdünnte Patientenprobe in die Wells pipettieren. Pipettieren Sie 100 µl **[SPE/DIL]** in Well A1 (Blank).
- 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren. Platte dabei keiner direkten Sonneneinstrahlung aussetzen.
- Waschen Sie die Wells 4-mal, wie in k. **WASCHVORGANG** beschrieben
- 100 µl gebrauchsfertiges Peroxidase-Konjugat in alle Wells pipettieren.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren. Platte dabei keiner direkten Sonneneinstrahlung aussetzen.
- Wiederholen Sie den Waschschrift wie in C.
- 100 µl gebrauchsfertiges TMB-Substrat in alle Wells pipettieren.
- Platte sofort dunkel stellen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
- 100 µl Stopplösung in alle Wells pipettieren. Vorsichtlich aufklappen, um eine gleichmäßige Farbverteilung sicherzustellen, und innerhalb von 10 Minuten messen.
- Stellen Sie vor dem Messen der Platte sicher, dass der Boden frei von Feuchtigkeit ist und keine Luftblasen in den Wells sind. Messen Sie die in den Wells entstandene Farbreaktion bei 450 nm mit einem geeigneten Platten-Photometer. Bei Photometern, die bei 2 Wellenlängen messen können, setzen Sie den Referenzfilter auf 620/630 nm.

Achtung: Die Extinktion (OD) des Blank muss immer von den ODs der Proben und Kontrollen subtrahiert werden.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

Lassen Sie die Wells zwischen den Inkubationen nicht austrocknen. Lassen Sie die Inkubationstemperaturen nicht oberhalb oder unterhalb des angegebenen Bereiches (18°C-25°C) abweichen.

k. WASCHVORGANG

Der Waschvorgang kann manuell mit einer Mehrkanal-Pipette oder auf einem automatischen Platten-Washer durchgeführt werden. Die Wells leeren, umdrehen und auf trockenem, saugfähigem Papier aufklappen. 4-mal Waschen mit einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden (300 µl).

13. TROUBLESHOOTING (PROBLEMLÖSUNGEN)

Bei konsequenter Einhaltung der ELISA Arbeitsvorschrift, sorgfältigem Umgang mit Reagenzien und sorgfältiger Pipettierung von Proben und Reagenzien können die folgenden Fehler / Probleme weitgehend vermieden werden.

Problem	Mögliche Ursachen
Keine Farbentwicklung nach Zugabe des TMB-Substrates	Kein Peroxidase-Konjugat pipettiert, Kontamination des Peroxidase-Konjugates (möglicherweise mit Kontrollseren während des Pipettierens) kann zu einer Inaktivierung führen.
Allgemein zu starke Reaktion	Falsches Peroxidase-Konjugat (z.B. nicht aus dem Original-Testkit), Inkubationszeit zu lang oder Inkubationstemperatur zu hoch, Wasserqualität für die Waschlösung nicht ausreichend (Grad der Deionisierung zu niedrig).
Allgemein zu schwache Reaktion	Falsches Peroxidase-Konjugat (z.B. nicht aus dem Original-Testkit), Inkubationszeit zu kurz oder Inkubationstemperatur zu niedrig.
Blank zu hoch	Ungenaues Pipettieren des Probenverdünnungspuffers, kontaminierte Reagenzien, Reagenzien verfallen, überschreiten der Inkubationszeit oder -temperatur, Plattenboden (Streifen) äußerlich verunreinigt (vorsichtig reinigen!).
Falsch positive / negative Proben	Falsche Verdünnung der Proben, bakteriell verunreinigte Proben.
Unerklärbare Ausreißer	Kontamination der Pipetten, Spitzen oder Behälter mit Metallen (Eisen, Kupfer etc.), unzureichendes Waschen.
Hohe Variation (Intraassay)	Reagenzien sowie Mikrotiterstreifen nicht auf Raumtemperatur vortemperiert. Waschgerät wäscht nicht korrekt!
Hohe Variation (Interassay)	Inkubationsbedingungen nicht konstant (Zeit, Temperatur) hohe Variation der Inkubationstemperaturen, Kontrollen und Proben nicht zur selben Zeit pipettiert (in denselben Intervallen) Pipettier-Reihenfolge prüfen, personenbezogene Variation, Streifen ausgetrocknet nach dem Waschen (unreproduzierbare Ergebnisse).

14. VALIDITÄT DES ASSAYS

Die Kontrollen sollten bei jedem Testlauf mitgeführt werden.

Folgende Kriterien zur Testvalidierung müssen erfüllt sein:

- OD-Wert der Negativen Kontrolle muss < 0.100 sein,
- OD-Wert der Cut-off Kontrolle muss >0.200 sein,
- Ratio der Positiven Kontrolle/ Cut-off-Wert muss ≥ 1.5 sein,
- OD-Wert des Blank muss < 0,100 sein.

Werden die Sollwerte nicht erreicht, sind die Testergebnisse der Proben invalide und der Test muss wiederholt werden.

15. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A QUALITATIVE BERECHNUNG

Berechnung des "Cut-off-Wertes"

Der **Cut-off-Wert** wird aus der Extinktion der Negativkontrolle und aus der Extinktion der Cut-off Kontrolle berechnet und definiert den Cut-off-Bereich.

$$\text{Cut-off-Wert} = \text{OD der Negativkontrolle} + \text{OD der Cut-off Kontrolle}$$

$$\text{CUT-OFF BEREICH} = \text{CUT-OFF WERT} \pm 10\%$$

Interpretation der Probenergebnisse:

ERGEBNIS	DEFINITION
negativ -	OD Probe < Cut-off-Wert -10%
grenzwertig	OD Probe \geq Cut-off-Wert -10% OD Probe \leq Cut-off-Wert +10%
positiv +	OD Probe > Cut-off-Wert +10%

Grenzwertige Ergebnisse sollten wiederholt werden. Um unspezifische Reaktionen bzw. Kreuzreaktionen, die auch zu einem grenzwertigen Ergebnis führen können, auszuschließen, empfehlen wir bei Bestätigung des grenzwertigen Testergebnisses eine **Verlaufskontrolle** anzuschließen.

Hinweis zum IgM Test: Um den Nachweis spezifischer IgM - Antikörper zu bestätigen, sollten grenzwertige und positive Proben mit VIRO- IgG RF-Sorbent wiederholt werden (Cod. VSB 100).

B BERECHNUNG DER RATIO (Cut-off-Index, COI):

Patientenproben können auch über eine Index-Berechnung beurteilt und quantifiziert werden, wobei der Index-Wert von 1,000 dem Cut-off-Wert entspricht.

$$\text{Index} = \text{OD-Wert der Probe bzw. Kontrolle} / \text{Cut-off-Wert}$$

Index < 0,9	negatives Ergebnis
Index 0,9 - 1,1	grenzwertiges Ergebnis
Index > 1,1	positives Ergebnis

C SEMI-QUANTITATIVE TITER-BERECHNUNG

Ein Auswertungsdiagramm ist beigefügt. Mit Hilfe des errechneten **Cut-off-Wertes** (y-Achse) und seinem festgelegten Titer von 1:100 (x-Achse) erhält man den 1. Punkt der semiquantitativen Eichgerade und trägt ihn in das Auswertungsdiagramm ein. Der 2. Punkt wird aus dem OD-Wert der **CONTROL+** (y-Achse) und deren Titer (siehe Etikett der Kontrolle) (x-Achse) ermittelt. Aus der linearen Verbindung der beiden Punkte entsteht die **semiquantitative Eichgerade**, aus der die jeweiligen Titer (x-Achse) der Patientenproben anhand ihrer gemessenen OD-Werte (y-Achse) abgelesen werden können. Die Linearität der Eichgeraden ist bis zu dem Titer der **CONTROL+** gewährleistet.

Proben mit einem Titer > dem der **CONTROL+** sind mit **SPE|DIL** nochmals weiter zu verdünnen.

Der Verdünnungsfaktor ist bei der Bestimmung der Titer zu berücksichtigen.

Die berechneten Titer der Patientenproben können auch als VU (VIRO- Einheiten) angegeben werden, z.B. ein Titer von 1:250 entspricht 250 VU.

Diagnostische Bedeutung und Interpretation der Ergebnisse siehe **Seite 1**.

Weitere Informationen finden Sie auch auf unserer Website:

<http://www.viro-immun.de/>

Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole / Símbolos/ Simboli/ Simbolos/ Symboly/ Címkéékén/ Συμβολα IVD

MTS Mikrotiterstreifen/ microtiterstrips/ Microplaques sensibilisées/ placa de microtítulo/ piasta microtitolo/ placa do microtite/ Mikrotitrační Stripy/ Mikrotitercsíkok/ Ταϊνίες μικροπιλοποίησης

SPE|DIL Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Redidlo na Vzorek/ Mintahígító/ Αραιωτικό Δείγματος

WASHBUF|25x Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promývaci Roztok 25x/ Mosópuferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x

CONJ|POD Peroxidase-Konjugat / Peroxidase conjugate / Conjugue Peroxidase/Conjugado Peroxidasa / coniugato con perossidasi/ conjugado Peroxidase/ Κοηjugát Peroxidáza/ Peroxidáz Κοηjugátum/ Συζευγμένη υπεροξειδάση

CONTROL- Negative Kontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ control negativo/ controllo negativo/ controle negativo / Negativní kontrola/ Negatív Kontroll/ αρνητικός Μάρτυρας

CUTOFF Cut-off Kontrolle/ cut-off control/ Contrôle cut-off/ control valor límite/ controllo limitante/ controle interrompção/ cut off kontrola/ cut off kontroll/ μάρτυρας αποκοπής

CONTROL+ Positive Kontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ control positivo/ controllo positivo/ controle positivo/ pozitivní kontrola/ pozitív kontroll/ θετικός μάρτυρας

SUBS|TMB TMB-Substrat/ TMB substrate/ substrat TMB/ substrato TMB / Substrát TMB/ TMB Szubsztrát/ Υπόστρωμα TMB

SOLN|STOP Stopplösung/ stop solution/ Solution d'arrêt/ solución de parada/ soluzione d'arresto/ solução de parada/ Stop Činidlo/ Stop Oldat/ Διάλυμα Τερματισμού

Bib Literatur/ Literature/ Littérature/ Bibliografia/ Bibliografia/ Literatura/ Irodalom/ Βιβλιογραφία

LOT Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote/ Číslo Šarže/ Lot Szám/ Αριθμός παρτίδας

IVD In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro Diagnostický Zdravotnický Prostředek/In Vitro Diagnosztikum/ Διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro

REF Artikel Nr./ reference or order number/ Référence ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commisione/ referência ou número de encomenda/ Katalogové Číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Καδικός Καταλόγου

96 96 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes / Počet Testů/ Vizsgálatok Száma/ Αριθμός εξετάσεων

i Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruções de uso/ Přečtěte si Návod k Použití/ Olvassa el a Használati Utasítást/ Δείτε Οδηγίες Χρήσεως

⚡ Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/ Teplotní Omezení/ Hőmérsékleti Korlátozások/ Θερμοκρασιακά όρια

🕒 Verfallsdatum:/ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di decadenza/ Limite de validade/ Datum Expirace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)

🏭 Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ Vgyöbce/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...

CE
Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12
email: info@viro-immun.de

ELISA-Test
(Semi-)Quantitatives Auswertungsdiagramm * (semi-)quantitative evaluation diagram

