



VIR-ELISA ANTI - TOXO - IgA



1. INTENDED USE

Enzyme immunoassay for determination of IgA specific antibodies to Toxoplasma gondii in human serum and plasma.

IgA [REF] EA 110 ▼ 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 IgA 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

In the diagnosis of Toxoplasmosis a test combination is recommended to differentiate between acute and past infection.

- The detection of **specific IgG antibodies** is positive 1 or 2 weeks after infection. The IgG titre reaches a maximum after a few weeks, then falls in the course of the following months, generally remaining at a low level lifelong.
- The determination of **IgM antibodies** is an important indicator of an acute infection, or congenital toxoplasmosis. As the first immune response to infection the IgM antibodies appear after a few days and disappear generally after 3-5 months.
- But IgM antibodies can persist for some years after infection so further tests are necessary to clarify the stage of the infection.
- The presence of IgA antibodies indicates an acute infection. IgA antibodies to Toxoplasma gondii occur 10-30 days after an acute infection, somewhat later than IgM antibodies, and disappear after 3-6 months.

IgG	IgM	IgA	Interpretation	Recommendation
-	-	-	No specific antibodies detectable	During pregnancy recheck in the 2nd and 3rd trimester.
-	+	+	Possible early phase of infection, probable recent infection, reinfection or latent infection may also be possible.	Monitoring of IgG, IgM antibodies (Sample collection within 10-14 days) to determine seroconversion; supplementary tests e.g. IFA, CF, ISAGA, immunoblot, determination of Toxo specific IgA antibodies and determination of the avidity of the Toxo specific IgG antibodies.
-	+	-		
+	+	+		
+	-	-	Possible past infection, probable congenital toxoplasmosis, or reinfection.	By suspect of acute infection – monitoring of IgG- and IgM-antibodies. supplementary tests e.g. IFA, CF, ISAGA, immunoblot, determination of Toxo specific IgA antibodies and determination of the avidity of the Toxo specific IgG antibodies.
+	-	+		

- negative, + positive

4. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity / Sensitivity

63 samples IgA were tested parallel in VIR ELISA ANTI-TOXO-IgA and comparison methods (ISAGA). The specificity and sensitivity are based on the results found.

Specificity: IgA 83,3% **Sensitivity:** IgA 80,4%

For the calculation of the **specificity and sensitivity** of the of the ELISA test, equivocal results were defined as positive. 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 IgA 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 IgA samples was < 10%.

5. [Bib]

- Groß, U. et al.: Immun. Infekt. 20, 151-154 (1992)
- Janitschke, K.: Klin. Lab. 40, 1059-1064 (1994)

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** [CONJ|POD|IgA]
One vial containing 12 ml of ready-to-use sheep anti-human IgA 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 (or 2x50 ml) of ready-to-use sample diluent buffer. The buffer includes 0.05% microbial preservative.
- WASH SOLUTION 25X** [WASH|BUF|25x]
One bottle containing 80 ml (or 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 if 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-litre 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 **CONJ|POD** from different kit lots. The **SUBS|TMB** must not be from the original test kit, but the lot of the **SUBS|TMB** must 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 controls have been tested for Hepatitis Bs antigen, anti-HIV I, anti-HIV 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 that 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.
- Microbial contaminated specimen may cause interferences.
- 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 \bar{x} 2-8°C.
For long-term storage \bar{x} -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.

Controls ready to use.

Note: To take into consideration pipetting time, it is recommended to repeat the **CUTOFF** after every 4 **MTS** (resp. after a pipetting time of ≥ 5 min.) to evaluate the following patient's tests with the new calculated cut-off value. In case of a semi quantitative determination, repeat the **CONTROL|+** 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 each control and each 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 colour 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 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 colorimetric reaction after addition TMB substrate	No Peroxidase conjugate dispensed, 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 deionisation)
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, microbial 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 (results are not reproducible).

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 the Negative Control should be < 0.100,
- OD-value of the Cut-off Control should be >0.200,
- Ratio of the 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.

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

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

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.

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/ Címkékén/ Συμβολα IVD

MTS	Mikrotiterstreifen/ microtiterstrips/ Microplaques sensibilisées/ placa de microtitulo/ piasta microtitolo/ placa do microtitre/ Mikrotitračni 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/ Mosópufferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x
CONJ/POD IgA	Peroxidase-Konjugat / Peroxidase conjugate / Conjugue Peroxidase/Conjugado Peroxidasa / coniugato con perossidasi/ conjugado Peroxidase/ Konjugát Peroxidáza/ Peroxidáz Konjugátum/ Συζευγμένη υπεροξειδάση IgA
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/ pozitivni 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 Cínidlo/ 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 Diagnostikum/ 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	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 instrucciones 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 Expírace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)
	Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ Výrobce/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...

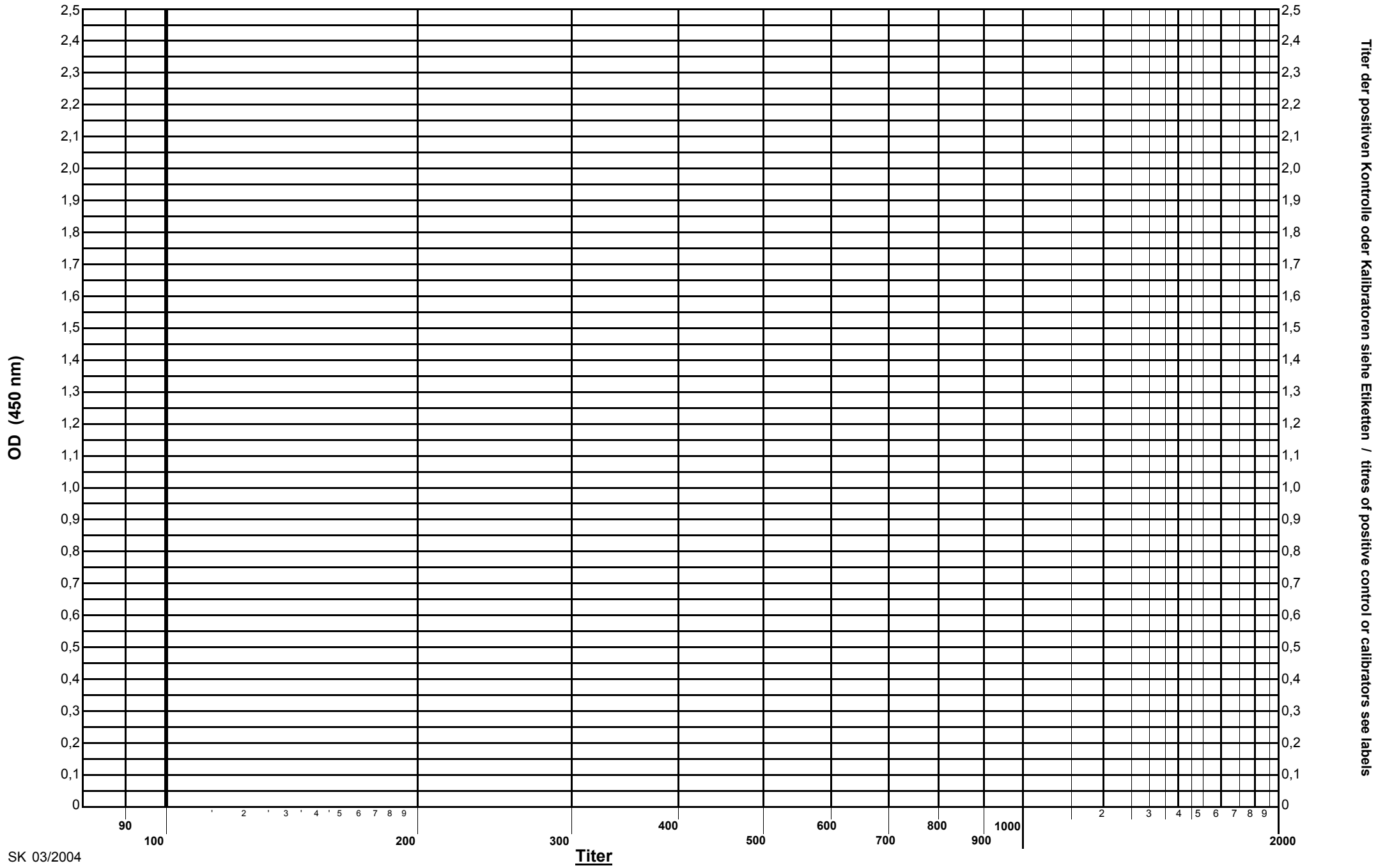


Viro-Immune Labor-Diagnostika GmbH, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12

email: info@viro-immun.de

 0123

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





VIR-ELISA ANTI - TOXO - IgA



1. VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen Toxoplasma gondii in humanem Serum und Plasma.

IgA [REF] EA 110 ▼ 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-IgA-Peroxidase-Konjugat pipettiert, das sich an die bereits gebundenen Antikörper anlagert. Im Waschprozess wird überschüssiges 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

Bei der Toxoplasmose-Diagnostik empfiehlt sich eine Testkombination, um eine Unterscheidung zwischen einer akuten und einer zurückliegenden Infektion zu treffen.

- Die Bestimmung von spezifischen **IgG-Antikörpern** im ELISA wird etwa 1-2 Wochen nach der Infektion positiv. Die Titer erreichen nach wenigen Wochen ihr Maximum, sinken anschließend im Verlauf von Monaten allmählich ab und bleiben in der Regel auf niedrigerem Niveau lebenslang positiv.
- Der Nachweis spezifischer **IgM-Antikörper** ist, neben der Verlaufskontrolle, ebenfalls ein wichtiger Hinweis für eine akute bzw. konnatale Infektion. Als Primärantwort des infizierten Organismus treten sie bereits einige Tage nach der Infektion auf und verschwinden in der Regel nach 3-5 Monaten wieder.
- Da IgM-Antikörper aber noch Jahre nach einer Infektion persistieren können, sind zur Abklärung des Infektionsstadiums weitere Tests notwendig. **IgA-Antikörper** gegen Toxoplasmose gondii treten ca. 10-30 Tage nach einer Infektion auf, etwas später als IgM-Antikörper und verschwinden nach ca. 3-6 Monaten.

IgG	IgM	IgA	Interpretation	Empfehlung
-	-	-	Keine Antikörper (Ak) nachweisbar.	Während der Schwangerschaft Kontrolluntersuchung im 2. und 3. Trimenon.
-	+	+	Sehr frühe Phase der Infektion möglich.	Verlaufskontrolle der IgG u. IgM-Ak (Proben im Abstand von 10-14 Tagen erneut testen): Serokonversion aufzeigen; Zusatzteste z.B. IFT, KBR, ISAGA, Immunoblot. Aviditätsbestimmung der Toxo-spezifischen IgG Ak; Bestimmung der Toxo-spezifischen IgA-Ak.
-	+	-	Vor kurzem erfolgte Infektion, oder akute/latente Infektion möglich.	
+	+	+		
+	-	-	Länger zurückliegende Infektion möglich, konnatale Toxoplasmainfektion oder Reinfektion möglich.	Bei Verdacht auf akute Infektion Verlaufs-kontrolle der IgG und IgM Ak durchführen. Zusatzteste z.B. IFT, KBR, ISAGA, Immunoblot. Aviditätsbestimmung der Toxo-spezifischen IgG Ak; Bestimmung der Toxo-spezifischen IgA-Ak.
+	-	+		

- negativ, + positiv

4. TESTCHARACTERISTIKA

Spezifität / Sensitivität

Es wurden 63 Proben parallel im VIR-ELISA ANTI- TOXO -IgA und in Vergleichsmethoden (ISAGA) getestet. Die Angaben zur Spezifität und Sensitivität des VIR-ELISA beziehen sich auf die gefundenen Testergebnisse.

Spezifität: IgA 83,3% **Sensitivität:** IgA 80,4%

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 IgA 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 IgA Test betragen < 10 %.

5. [Bib]

- Groß, U. et al.: Immun. Infekt. 20, 151-154 (1992)
- Janitschke, K.: Klin. Lab. 40, 1059-1064 (1994)

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|IgA]

Ein Fläschchen (12 ml) Anti-human-IgA -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 [SPE|DIL]

Ein Fläschchen (100 ml) oder (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 $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$ 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 $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$ in Gegenwart von Trockenmittel zu lagern und bis zu 4 Wochen haltbar. Die Gebrauchsverdünnung des [WASHBUF] ist bis zu 4 Wochen bei $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$ 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 **[VD]** hergestellt.

- Chargenspezifische Reagenzien wie **[MTS]**, Kontrollen und **[CONJ|POD]** aus Kits unterschiedlicher Chargen nicht austauschen. **[SUBS|TMB]** muss chargenspezifisch, nicht aber kitspezifisch verwendet werden. **[SPE|DIL]** (außer Immuncaptureassays), **[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 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 Kupferferrohen 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.
- Hinweise:** 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!

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 der verdünnten Patientenproben 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. WASCHEVORGANG 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. Vorsichtig aufklopfen, 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 OD's 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. WASCHEVORGANG

Der Waschvorgang kann manuell mit einer Mehrkanal-Pipette oder auf einem automatischen Platten-Waschgerät durchgeführt werden. Die Wells leeren, umdrehen und auf trockenem, saugfähigem Papier aufklopfen. 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 Behältern 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 nach dem Waschen ausgetrocknet (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 $\geq 1,5$ 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.

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.

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

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

C SEMI-QUANTITATIVE TITER-BERECHNUNG

Ein Auswertungsdigramm 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 Auswertungsdigramm 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/ Címekékén/ Συμβολα IVD

MTS	Mikrotiterstreifen/ microtiterstrips/ Microplaques sensibilisées/ placa de microtítulo/ piasta microtitolo/ placa do microtítire/ Mikrotitračni Stripy/ Mikrotitercsíkok/ Ταϊνίες μικροπιλοποίησης
SPE DIL	Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Ředidlo 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 IgA	Peroxidase-Konjugat / Peroxidase conjugate / Conjugue Peroxidase/Conjugado Peroxidasa / coniugato con perossidasi/ conjugado Peroxidase/ Κοιυγάτ Peroxidáza/ Peroxidáz Κοιυγάτum/ Συζευγμένη υπεροξειδάση IgA
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 interrupção/ cut off kontrola/ cut off kontroll/ μάρτυρας αποκοπήs
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 commissione/ referência ou número de encomenda/ Katalogové Číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Κωδικός 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/ Přečtete 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/ Vyrobcé/ 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

CE 0123

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

