

NovaLisa[®]

TBE/FSME IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	7
Français	13
Italiano	19
Español	24
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	30
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	30
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	31
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	32

Product Number: TICG0440 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Tick-borne encephalitis (TBE) virus is a flavivirus of the family *Togaviridae*. It is an enveloped single-stranded RNA virus with cubic icosahedral symmetry and ranges in size from 20-80nm in diameter.

Three subtypes can be distinguished which show only little differences in their structural proteins.

TBE virus is mainly transmitted by ticks. The degree of contamination of ticks (and thus humans) in central Europe increases from west to east, and anybody may be affected. Specific antibody development yields a life-long immunity.

TBE is the most important tick-transmitted disease of man -beside Lyme disease, which is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi*. The clinical course of the disease depends on the immune status of the infected persons. A high virus production in the primary infected tissues is required for the passage of the blood-brain barrier and the resulting severe manifestations in the central nervous system.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
TBE/FSME Virus	Tick-borne encephalitis CEE (Central European Encephalitis)	Phase 1: unspecific flu-like symptoms (mild fever, headache, muscle pain, joint pain, gastrointestinal complaints) Phase 2: high fever, development of meningitis and / or encephalitis	By tick bites (<i>Ixodes ricinus</i> , western subtype; <i>Ixodes persulcatus</i> , eastern subtype). Rarely by infected (non- pasteurized) milk.

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Serology: e.g. ELISA, Neutralization, Hemagglutination Inhibition, Complement Fixation

2. INTENDED USE

The NovaTec TBE/FSME IgG ELISA is intended for the quantitative determination of IgG class antibodies against TBE virus in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

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

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

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break apart 8-well snap-off strips coated with TBE/FSME Virus antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Standards:** 5 vials, each containing 2 mL standard; coloured yellow; ready to use; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
Standard A: 0 NTU/mL; blue cap
Standard B: 50 NTU/mL; green cap
Standard C: 130 NTU/mL; yellow cap [NTU = NovaTec Units]
Standard D: 200 NTU/mL; red cap
Standard E: 300 NTU/mL; white cap

For hazard and precautionary statements see 12.1.

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

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

6. REAGENT PREPARATION

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

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with TBE/FSME Virus antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37°C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate blank:** Absorbance value < 0.100
- **Standard A:** Absorbance value < 0.200
- **Standard B:** Absorbance value > 0.050
- **Standard C:** Absorbance value $>$ Standard B
- **Standard D:** Absorbance value $>$ Standard C
- **Standard E:** Absorbance value > 1.000

Standard A $<$ Standard B $<$ Standard C $<$ Standard D $<$ Standard E

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

9.2. Calculation of Results

In order to obtain quantitative results in NTU/mL plot the (mean) absorbance values of the 5 Standards A, B, C, D and E on (linear/Linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0, 50, 130, 200, and 300 NTU/mL) and draw a standard calibration curve (absorbance values on the vertical y-axis, concentrations on the horizontal x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each patient sample.

For the calculation of the standard-curve mathematical Point to Point function should be used.

9.3. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own patient populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

Positive	> 110 NTU/mL	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine). <u>After vaccination:</u> This is a case of seroconversion. Check anamnestic data and if necessary complete basic immunization or give a booster
Equivocal	55 –110 NTU/mL	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative . <u>After vaccination:</u> This may be a case of seroconversion. Continue with basic immunisation or booster. Repeat test within 2-4 weeks. A non-specific reaction is not excluded.
Negative	< 55 NTU/mL	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely. <u>After vaccination:</u> No seroconversion after vaccination. This may be the case after the first vaccination during basic immunisation. Patients which show low or no response.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

9.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

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

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	1.411	3.51
#2	24	1.991	2.23
#3	24	1.913	8.93

Interassay	n	Mean (NTU/mL)	CV (%)
#1	12	26.55	9.18
#2	12	15.38	12.99
#3	12	253.81	10.48

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 100% (95% confidence interval: 93.84% - 100%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100% (95% confidence interval: 96.31% - 100%).

10.4. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity (according to CLSI EP17-A) is defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator. It is 1.78 NTU/mL.

10.5. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.6. Cross Reactivity

Cross reactivity with other flaviviruses cannot be excluded and should be taken into account for result interpretation.

10.7. Measurement range

The measurement range is 1.78 NTU/mL – 300 NTU/mL.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: TICG0440 TBE/FSME IgG ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Das die Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) verursachende Virus gehört zum Genus Flavivirus in der Familie der Flaviviridae. Es handelt sich um ein umhülltes Einzelstrang RNA Virus von dem 3 Typen unterschieden werden können, die lediglich geringfügige Unterschiede im Aufbau ihrer Strukturproteine aufweisen. Zwischen den europäischen und fernöstlichen Subtypen bestehen große Antigengemeinschaften. Die Übertragung erfolgt durch Zeckenstich, sehr selten durch virusinfizierte Milch von Ziegen und Schafen, in Ausnahmefällen auch von Kühen. Eine Infektion von Mensch zu Mensch gibt es nicht. Das primäre Erregerreservoir sind Kleinsäugerpopulationen, insbesondere Mäuse, aber auch Vögel, Rehe und Rotwild. FSME-Virus übertragende Zecken kommen in vielen europäischen Ländern und in Asien vor.

Die Krankheit tritt in Abhängigkeit von der Aktivität der virustragenden Zecken bevorzugt im Frühjahr und im frühen Sommer auf, in manchen Jahren wird auch ein Herbstgipfel beobachtet. Bei warmer Witterung kann sie auch in anderen Jahreszeiten vorkommen.

Der Krankheitsverlauf ist biphasisch. Es kommt zunächst zu grippeähnlichen Symptomen mit mäßigem Fieber (in der Regel nicht über 38°C), Kopfschmerzen, Erbrechen, Schwindelgefühl. Nach einem fieberfreien Intervall von etwa einer Woche (bis zu 20 Tagen) entsteht bei etwa 10 % dieser Patienten eine Meningoenzephalitis mit Fieber, Erbrechen, meningealen Reizerscheinungen, vereinzelt Auftreten von Stupor oder Koma. Vor allem bei älteren Patienten kann sich zusätzlich eine Myelitis entwickeln. In diesen Fällen besteht die Gefahr von bleibenden neurologischen Ausfällen, in der Regel in Form von Paresen, aber auch von Anfallsleiden oder lange andauernden Kopfschmerzen. Diese Symptome können oft Monate nach der Erkrankung persistieren. Häufig kommt es jedoch selbst nach schweren Verläufen zur völligen Heilung. Bei 1-2 % der Erkrankten mit ZNS-Beteiligung führt die Erkrankung zum Tode. Schwere Krankheitsverläufe werden fast nur bei Erwachsenen beobachtet.

Die aktive Immunisierung stellt einen wirksamen Schutz für potenziell gefährdete Einwohner und Besucher von Risikogebieten dar.

Eine postexpositionelle Immunglobulinprophylaxe erreicht gegenüber der aktiven Immunisierung eine deutlich geringere Schutzrate, die mit etwa 60 % angegeben wird.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
TBE/FSME Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis CEE (Central European Encephalitis)	Phase 1: Unspezifische grippeartige Symptome (leichtes Fieber, Kopf-, Muskel-, Gliederschmerzen, gastrointestinale Beschwerden) Phase 2: hohes Fieber, Entwicklung einer Meningitis und/oder Enzephalitis	Stiche von infizierten Zecken (Ixodes ricinus, western subtype; Ixodes persulcatus, eastern subtype); Selten durch infizierte Milch (nicht pasteurisierte)

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Serologie: z.B. ELISA, Neutralisationstest, Hämagglutinations-Hemmtest, Komplementbindungsreaktion

2. VERWENDUNGSZWECK

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

3. TESTPRINZIP

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

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

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

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit TBE/FSME virus Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Standards:** 5 Fläschchen mit 2 mL Standardlösung gelb gefärbt; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
Standard A: 0 NTU/mL; blaue Verschlusskappe
Standard B: 50 NTU/mL; grüne Verschlusskappe
Standard C: 130 NTU/mL; gelbe Verschlusskappe [NTU = NovaTec Units]
Standard D: 200 NTU/mL; rote Verschlusskappe
Standard E: 300 NTU/mL; weiße Verschlusskappe

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37°C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

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

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit TBE/FSME virus

Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden.. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z. B. 10 µL Probe und 1 mL IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschritte von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

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

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < 0,100
- **Standard A:** Extinktionswert < 0,200
- **Standard B:** Extinktionswert > 0,050
- **Standard C:** Extinktionswert > Standard B
- **Standard D:** Extinktionswert > Standard C
- **Standard E:** Extinktionswert > 1,000

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D < Standard E

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

9.2. Messwertberechnung

Um quantitative Ergebnisse in NTU/mL zu erhalten, die Extinktionswerte der fünf Standards A, B, C, D und E gegen ihre entsprechende Konzentration (0, 50, 130, 200, 300 NTU/mL) auftragen und eine Standardkurve erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

Anhand dieser Standardkurve Ergebnisse die gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Zur Berechnung der Standardkurve sollte die mathematische „Punkt zu Punkt“ Funktion gewählt werden.

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Patientenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden.

Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

Positiv	>110 NTU/mL	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden. <u>Nach Impfungen</u> Serokonversion nach Impfung Impfdaten prüfen, wenn nötig Grundimmunisierung vervollständigen bzw. Auffrischen.
Grenzwertig	55 - 110 NTU/mL	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ . <u>Nach Impfungen</u> Serokonversion nach Impfung möglich mit der Grundimmunisierung fortfahren bzw. Auffrischen unspezifische Reaktionen sind nicht ausgeschlossen
Negativ	<55 NTU/mL	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich. keine Serokonversion nach Impfung <u>Nach Impfungen</u> keine Serokonversion nach Impfung möglich nach der ersten Teilimpfung bei Grundimmunisierung Patienten mit langsamer oder fehlender Impfantwort

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

9.3.1. Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

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

10. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	1,411	3,51
#2	24	1,991	2,23
#3	24	1,913	8,93

Interassay	n	Mittelwert (NTU/mL)	Vk (%)
#1	12	26,55	9,18
#2	12	15,38	12,99
#3	12	253,81	10,48

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100% (95% Konfidenzintervall: 93,84% - 100%).

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 100% (95% Konfidenzintervall: 96,31% - 100%).

10.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Tests (gemäß CLSI EP17-A) ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie ist 1,78 NTU/mL.

10.5. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/mL Hämoglobin, 5 mg/mL Triglyceride und 0,5 mg/mL Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.6. Kreuzreaktivität

Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren können nicht ausgeschlossen werden und sollten bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

10.7. Messbereich

Der Messbereich ist 1,78 NTU/mL – 300 NTU/mL.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: TICG0440 TBE/FSME IgG ELISA (96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Le virus de l'encéphalite à tiques est un flavivirus de la famille Togaviridae. C'est un virus ARN monocaténaire enveloppé avec une symétrie icosaédrique et cubique de 20-80nm de diamètre.

Il n'y a que trois sous-types antigéniques existents. Ceux-ci montrent seulement des petites différences en leurs protéines structurales.

Le virus de l'encéphalite à tiques est principalement transmis par des tiques. Le pourcentage de tiques contaminées (et ainsi le nombre des humains infectés) en Europe centrale augmente de l'Ouest à l'Est, et tout le monde peut être affecté. Le développement d'anticorps spécifiques rapporte une immunité qui dure toute la vie.

Le virus de l'encéphalite à tiques est la maladie la plus importante transmise par des tiques, à part de la maladie de Lyme, qui est causée par *Borellia burgdorferi*. Le développement clinique de la maladie dépend du statut immunitaire des personnes infectées. Une production élevée de virus dans les tissus infectés en premier est exigée pour le passage par la barrière hémato-méningée, qui produit des manifestations graves dans le système nerveux central.

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de transmission
virus de l'encéphalite à tiques	Encéphalite à tiques - encéphalite d'Europe centrale	Phase 1 : symptômes non spécifiques de la grippe (fièvre légère, maux de tête, douleurs musculaires, douleurs articulaires, troubles gastro-intestinaux) Phase 2: fièvre élevée, développement de méningite et / ou d'encéphalite	Transmission principalement par des piquères de tiques (<i>Ixodes ricinus</i> , western subtype; <i>Ixodes persulcatus</i> , eastern subtype); Rarement par l'ingestion de lait infecté (non pasteurisé).

L'infection ou la présence d'un agent pathogène peut être identifiée par:

- Sérologie : p. ex. ELISA, neutralisation, Inhibition d'hémagglutination, test de fixation du complément

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse TBE/FSME IgG ELISA est prévue pour la détection quantitative des anticorps IgG anti-TBE/FSME virus dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

3. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique quantitative des anticorps spécifiques est basée sur la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Plaques de Microtitrage sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène de TBE/FSME; en sachets d'aluminium refermables.
- **Tampon de Dilution d'Échantillon IgG:** 1 flacon contenant 100 mL de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH $7,2 \pm 0,2$; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solution d'Arrêt:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de Lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH $7,2 \pm 0,2$) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 20 mL d'anticorps IgG anti-humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur bleue, bouchon noir.
- **Solution de Substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), $< 0,1\%$; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Étalons:** 5 flacons contenant chacun 2 mL étalon; de couleur jaune; prêt à l'emploi; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
Étalon A : 0 NTU/mL; bouchon bleu
Étalon B : 50 NTU/mL; bouchon vert
Étalon C : 130 NTU/mL; bouchon jaune
Étalon D : 200 NTU/mL; bouchon rouge
Étalon E : 300 NTU/mL; bouchon blanc

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 12.1.

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

4.3. Matériel et équipement requis

- Photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaque de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 μ L
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8°C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20 ... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

6.1. Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de TBE/FSME. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrette restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

6.2. Tampon de Lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de Lavage 1+19; par exemple 10 mL du Tampon de Lavage + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon de Lavage diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

6.3. Solution de Substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec Tampon de Dilution d'Échantillon IgG. Diluer 10 µL d'échantillon avec 1 mL I Tampon de Dilution d'Échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDE DE TEST

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de Lavage de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

1. Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL du Tampon de Lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape.
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats !
5. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20...25°C).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µL de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20...25°C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µL de la Solution d'Arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la Solution de Substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la Solution d'Arrêt.

8.1. Mesure

Réglez le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ces instructions d'utilisation doivent être strictement suivies, et les critères suivants doivent être respectés:

- Blanc Substrat: Valeur d'absorbance < **0,100**
- **Étalon A:** Valeur d'absorbance < **0,200**
- **Étalon B:** Valeur d'absorbance > **0,050**
- **Étalon C:** Valeur d'absorbance > **Étalon B**
- **Étalon D:** Valeur d'absorbance > **Étalon C**
- **Étalon E:** Valeur d'absorbance > **1,000**

Étalon A < Étalon B < Étalon C < Étalon D < Étalon E

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des **résultats quantitatifs en NTU/mL**, inscrire les valeurs (moyennes) d'absorption des 5 standards A, B, C, D et E sur papier millimétré (linéaire/ linéaire) dans un système de coordonnées.

Inscrire les valeurs d'absorption sur l'axe verticale et leurs concentrations correspondantes (0, 10, 50, 130, 200 et 300 NTU/mL) sur l'axe horizontale, et dessiner une courbe d'étalonnage standard.

Lire les résultats de cette courbe standard en utilisant les valeurs (moyennes) d'absorbance de chaque spécimen patient.

Pour le calcul de la courbe standard le mathématique fonction « point à point » peuvent être employées.

9.3. Interprétation des résultats

Des gammes normales de valeur pour cet ELISA devraient être établies par chaque laboratoire basé sur ses propres patients (des variations géographiques peuvent se produire).

Les valeurs suivantes devraient être considérées comme directives :

Positif	> 110 NTU/mL	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il ya eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin). <u>Après la vaccination</u> ceci est un cas de séroconversion vérifier les données anamnestiques et accomplir l'immunisation e base au besoin, ou administrer un booster
Zone grise	55-110 NTU/mL	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore dans la zone grise l'échantillon est jugé négatif . <u>Après la vaccination</u> peut être un cas de séroconversion continuer l'immunisation de base ou booster - répéter le test dans un délai de 2-4 semaines une réaction non spécifiques n'est pas exclue
Négatif	< 55 NTU/mL	L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable. <u>Après la vaccination</u> - aucune séroconversion après la vaccination peut se produire après la première vaccination pendant L'immunisation de base. patients qui ne montrent une réponse basse ou aucune réponse

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limité dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

9.3.1. Isotypes d'anticorps et l'Etat de l'infection

Sérologie	Signification
IgM	Caractéristique de la réponse primaire du anticorps Titre élevé d'IgM avec une faible titre d'IgG : → suggère une infection très récente ou aiguë Rare: → persistante IgM
IgG	Caractéristique de la réponse secondaire du anticorps Peut persister pendant plusieurs années Des titres élevés d'IgG à faible titre d'IgM: → peuvent indiquer une infection ancienne

10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties. Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Précision

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
#1	24	1,411	3,51
#2	24	1,991	2,23
#3	24	1,913	8,93
Inter-essai	n	moyenne (NTU/mL)	CV (%)
#1	12	26,55	9,18
#2	12	15,38	12,99
#3	12	253,81	10,48

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 100% (95% Intervalle de confiance: 93,84% - 100%).

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 100% (95% Intervalle de confiance: 96,31% - 100%).

10.4. Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique (selon CLSI EP17-A) définie comme la concentration apparente de l'analyte qui peut être distinguée de l'étalon zero est 1,78 NTU/mL.

10.5. Interférences

Des échantillons hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/mL de hémoglobine, 5 mg/mL de triglycérides et 0,5 mg/mL de bilirubine.

10.6. Réaction croisée

La réactivité croisée avec d'autres flavivirus ne peut être exclu et doit prendre en compte pour l'interprétation des résultats.

10.7. Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure est 1,78 NTU/mL – 300 NTU/mL.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.


12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaque de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

12.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3 :1) ou du MIT (voir chapitre 4.1)

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

	Attention	H317	Peut provoquer une allergie cutanée
		P261	Éviter de respirer les aérosols
		P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
		P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau
		P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
		P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

12.2. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence: TICG0440 TBE/FSME IgG ELISA (96 déterminations)

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

Il Virus dell'encefalite da zecca dell'Europa centrale fa parte del gruppo dei Flaviviridae. Si tratta di un virus con involucro contenente RNA a singolo filamento. È possibile distinguerne tre tipi diversi. Gli antigeni dei tipi europei e orientali sono comuni. La trasmissione avviene attraverso il morso di zecche oppure raramente attraverso latte infetto di pecore e capre. Non esiste una trasmissione diretta tra essere umani. Il serbatoio biologico sono soprattutto topi ma anche uccelli, e cervi. Le zecche che trasmettono il virus si trovano in molti paesi europei e asiatici. Il numero delle persone infette aumenta in primavera e all'inizio dell'estate. La manifestazione della malattia si divide in due fasi. I primi sintomi sono febbre, in genere non più alta di 38°C, cefalea, vomito e vertigini. Dopo un intervallo senza febbre di circa una settimana (può durare anche fino a 20 giorni) tornano i sintomi febbre, vomito, stupore ed anche coma. I pazienti anziani spesso dimostrano anche i sintomi di una mielite. In questi casi possono aversi paralisi degli arti e dei muscoli del collo e del dorso. È possibile prevenire l'insorgere della malattia, che spesso ha esito mortale (1-2%), con il ricorso a vaccinazioni.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
TBE VIRUS	Encefalite trasmessa da zecche - Encefalite centroeuropea, CEE	Fase 1: sintomi non specifici simil-influenzali (lieve febbre, mal di testa, dolori muscolari, dolori articolari, disturbi gastrointestinali) Fase 2: febbre alta, lo sviluppo di meningite e / o encefalite	Morso di zecche (Ixodes ricinus, western subtype; Ixodes persulcatus, eastern subtype); Raramente da infetto latte (non pastorizzato)

L'infezione o la presenza di un agente patogeno può essere identificata da:

- Sierologia: p. es. ELISA, test di neutralizzazione, Inibizione dell'emoagglutinazione, fissazione del complemento

2. USO PREVISTO

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

3. PRINCIPIO DEL TEST

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

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

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

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della TBE/FSME; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione IgG:** 1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Soluzione Bloccante:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di Lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco.
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 20 mL di anticorpi IgG anti-umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Standards:** 5 flaconi, contenenti 2 mL; color giallo; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
Standard A: 0 NTU/mL; tappo blu
Standard B: 50 NTU/mL; tappo verde
Standard C: 130 NTU/mL; tappo giallo [NTU = NovaTec Units]
Standard D: 200 NTU/mL; tappo rosso
Standard E: 300 NTU/mL; tappo bianco

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 12.1.

Per le sostanze potenzialmente pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3. Materiali e attrezzature necessari

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

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

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

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

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

6.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con l'antigeni della TBE/FSME. Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

6.2. Tampone di Lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone de Lavaggio 1+19; per esempio 10 mL del Tampone de Lavaggio + 190 mL di acqua distillata. Il Tampone de Lavaggio diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3. Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70...-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.

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

7.1. Diluizione dei campioni

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

8. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone de Lavaggio da 300 a 350 μ L per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

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

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

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

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

8.1. Misurazione

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

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

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

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

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

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

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

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza $< 0,100$
- **Standard A:** Valore di assorbanza $< 0,200$
- **Standard B:** Valore di assorbanza $> 0,050$
- **Standard C:** Valore di assorbanza $> \text{Standard B}$
- **Standard D:** Valore di assorbanza $> \text{Standard C}$
- **Standard E:** Valore di assorbanza $> 1,000$

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D < Standard E

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

9.2. Calcolo dei risultati

Per ottenere i **risultati quantitativi in NTU/mL**, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze degli Standards A, B, C, D, E sull'asse dell'Y e ponendo le concentrazioni (0, 50, 130, 200, 300 NTU/mL) sull'asse della X su cui tracciare la curva standard.

Leggere i risultati (le concentrazioni in NTU/mL) a partire di questa curva di calibrazione standart utilizzando i valori (medi) assorbanza campione di ogni singolo paziente.

Per calcolare la curva di calibrazione, la "punto a punto" funzione matematica dovrebbe essere usata.

9.3. Interpretazione dei risultati

Gli intervalli in cui i valori sono normali per questo ELISA devono essere stabiliti da ogni singolo laboratorio basandosi sulla loro popolazione relativa all'area geografica servita.

I seguenti risultati possono considerarsi indicativi:

Positivo	>110 NTU/mL	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino). <u>Dopo la vaccinazione</u> siero conversione dopo vaccinazione Controllare i dati risultanti dalla vaccinazione, ripetere la vaccinazione di base se necessario.
Zona grigia	55 – 110 NTU/mL	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. Se il risultato è nuovamente nella zona grigia, il campione viene giudicato come negativo . <u>Dopo la vaccinazione</u> possibile siero conversione dopo vaccinazione Continuare con la vaccinazione di base oppure ripetere Reazioni a specifiche non possono escludersi
Negativo	<55 NTU/mL	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile. nessuna siero conversione dopo vaccinazione <u>Dopo la vaccinazione</u> Possibile dopo il primo richiamo della vaccinazione di base Pazienti con una risposta immunitaria lenta oppure assente

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test.
È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.
I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

9.3.1. Isotipi degli anticorpi e Stato dell'infezione

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

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

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

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	1,411	3,51
#2	24	1,991	2,23
#3	24	1,913	8,93
Interdosaggio	n	Media (NTU/mL)	Cv (%)
#1	12	26,55	9,18
#2	12	15,38	12,99
#3	12	253,81	10,48

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analiti specifici.

La specificità diagnostica è 100% (95% intervallo di confidenza: 93,84% - 100%).

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di analiti specifici.

La sensibilità diagnostica è 100% (95% intervallo di confidenza: 96,31% - 100%).

10.4. Sensibilità analitica

La sensibilidad analítica (segundo CLSI EP17-A) se define como la menor concentración que se puede distinguir del estándar cero. Es de 1,78 NTU/mL.

10.5. Possibili interferenze

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

10.6. Reattività crociata

Reattività crociata con altri flavivirus non può essere esclusa e deve essere preso in considerazione quando si interpretano i risultati.

10.7. Campo di misura

Il campo di misura è 1,78 NTU/mL – 300 NTU/mL.

11. LIMITAZIONI

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

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

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

12.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 4.1)

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

Attenzione



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

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

12.2. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: TICG0440 TBE/FSME IgG ELISA (96 determinazioni)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCION

El virus que causa la encefalitis centroeuropea pertenece al género de los Flavivirus de la familia de los Flaviviridae. Se trata de un virus de A.R.N. de cadena simple con envoluta y se distinguen tres tipos diferentes. Entre los tipos europeos y los subtipos orientales existen grandes similitudes en los antígenos. La transmisión es por la picadura de la garrapata, muy pocas veces por leche infectada de cabras u ovejas, en casos excepcionales de vacas. No existe una transmisión entre humanos. El depósito del germen patógeno son mamíferos pequeños, sobre todo ratones, pero también aves, corzos y venado. Las garrapatas que transmiten el virus viven en muchos países europeos y asiáticos. La enfermedad se manifiesta dependiendo de la actividad de la garrapata sobre todo en la primavera y principios del verano, en algunos años se detecta también una cumbre en otoño. El curso es bifásico. Al principio la enfermedad produce síntomas parecidos a la gripe con fiebre leve, dolores de cabeza, vómitos, náuseas. Pasado una temporada libre de fiebre (7 a 20 días) se produce una meningoencefalitis en aprox. el 10% de los pacientes con fiebre, vómitos, irritaciones meníngeas, a veces estupor o coma. Sobre todo en ancianos se desarrolla de momento una mielitis. Estos casos incluyen el riesgo de fallos neurológicos persistentes, por regla general en forma de parálisis, pero también sufriendo de ataques o de dolores de cabeza persistentes. Los síntomas persisten muchas veces años después de la infección. Muchos casos graves sin embargo llegan a la curación completa. El 1 al 2% de los casos en los que el sistema nervioso central está afectado son letales. Los cursos malignos de la enfermedad casi solamente se ven en adultos.

La inmunización activa es una protección eficaz para habitantes y visitantes de áreas de alto riesgo de contagio. En comparación con la protección de la inmunización post-infecciosa esta tiene mucho menor eficacia (aprox. 60%).

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
Virus de la encefalitis por garrapatas (TBEV),	Encefalitis transmitida por garrapatas (meningoencefalitis de garrapata (TBE))	Fase 1: síntomas inespecíficos similares a la gripe (fiebre leve, dolor de cabeza, dolor muscular, dolor en las articulaciones, dolencias gastrointestinales) Fase 2: fiebre alta, desarrollo de meningitis y / o encefalitis	Picadura de la garrapata (Europa del oeste: Ixodes ricinus; Europa del este: Ixodes persulcatus); En raras ocasiones por la leche infectada (no pasteurizada).

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- Serología: p.ej. ELISA, neutralización, inhibición de hemaglutinación, fijación del complemento

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima TBE/FSME IgG ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra TBE/FSME virus en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cuantitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las placas de microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de placa de microtitulación ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de TBE/FSME, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestras IgG :** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH $7,2 \pm 0,2$; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH $7,2 \pm 0,2$; tapa blanca.
- **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color azul; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), $< 0,1\%$; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Soluciones Estándar :** 5 botellas, conteniendo cada una 2 mL de solución coloreada en amarillo listas para ser utilizadas; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
Estándar A: 0 NTU/mL; tapa azul
Estándar B: 50 NTU/mL; tapa verde
Estándar C: 130 NTU/mL; tapa amarilla [NTU = NovaTec Unidades]
Estándar D: 200 NTU/mL; tapa roja
Estándar E: 300 NTU/mL, tapa blanca

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático de Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 μ L)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígeno de TBE/FSME. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir el Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL del Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. El Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras IgG, por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras IgG, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado) en el esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL del Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20...25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetear 100 µL de la Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20...25^\circ\text{C}$).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el Blanco.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en el esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < 0,100
- **Estándar A:** valor de la extinción < 0,200
- **Estándar B:** valor de la extinción > 0,050
- **Estándar C:** valor de la extinción > Estándar B
- **Estándar D:** valor de la extinción > Estándar C
- **Estándar E:** valor de la extinción > 1,000

Estándar A < Estándar B < Estándar C < Estándar D < Estándar E

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

9.2. Cálculo de los resultados

Para obtener resultados **cuantitativos en NTU/mL**, representar la (media) absorbancia de los calibradores A, B, C, D y E en papel gráfico (lineal/Lineal) en el eje vertical (Y) y sus concentraciones (0, 50, 130, 200, 300 NTU/mL) en el eje horizontal (X). Trazar la curva correspondiente.

Con esta curva estándar se pueden ver los resultados por el promedio de las extinciones de las pruebas de los pacientes.

Para el cálculo de la curva estándar se debe utilizar la función matemática punto a punto.

9.3. Interpretación de los resultados

Las normas para los resultados del ELISA tienen que estar establecidas con el colectivo respectivo de los pacientes en el área del laboratorio.

Estos son los datos normativos:

Positivo	>110 NTU/mL	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna). seroconversión después de la vacunación: <u>Después de la vacunación</u> seroconversión después de la vacunación Verificar los datos de la vacunación, si necesario completar la inmunización de base o la Revacunación
Zona intermedia	55 – 110NTU/mL	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa . <u>Después de la vacunación</u> seroconversión es posible Continuar con la inmunización de base o la revacunación Reacciones no específicas no son excluidas
Negativo	<55 NTU/mL	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable. <u>Después de la vacunación</u> no hay seroconversión después de la vacunación posible después de la primera parte de la vacunación pacientes con resupuesta inmunitaria lenta o ausente

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo.

Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico.

Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.

9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

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

10. CARACTERISTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	1,411	3,51
#2	24	1,991	2,23
#3	24	1,913	8,93
Inter ensayo	n	Promedio (NTU/mL)	CV (%)
#1	12	26,55	9,18
#2	12	15,38	12,99
#3	12	253,81	10,48

10.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 93,84% - 100%).

10.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 96,31% - 100%).

10.4. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (según CLSI EP17-A) se define como la menor concentración que se puede distinguir del estándar cero. Es de 1,78 NTU/mL.

10.5. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

10.6. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada con otros flavivirus no se puede excluir y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

10.7 Intervalo de medición

El intervalo de medición es 1,78 NTU/mL – 300 NTU/mL.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: TICG0440 TBE/FSME IgG ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

Flaviviridae (2009). In Herbert Hof, Rüdiger Dörries, Gernot Geginat: Medizinische Mikrobiologie. [Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene] ; 237 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe), pp. 207–213.

Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) / Russische Frühjahrs-Sommer-Enzephalitis (2011). In Robert Koch Institut (RKI): Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. Berlin, 14-15.

Amicizia, Daniela; Domnich, Alexander; Panatto, Donatella; Lai, Piero Luigi; Cristina, Maria Luisa; Avio, Ulderico; Gasparini, Roberto (2013): Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. In *Human vaccines & immunotherapeutics* 9 (5), pp. 1163–1171. DOI: 10.4161/hv.23802.

Bienz, Kurt A. (2005): Viruses as Human Pathogen. In Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rolf M. Zinkernagel: Medical microbiology. Stuttgart, New York: Thieme (Thieme Flexibook), pp. 412–474.

Donoso Mantke, O.; Escadafal, C.; Niedrig, M.; Pfeffer, M.; Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus, C. (2011): Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. In *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 16 (39).

Hofmann, H.; Frisch-Niggemeyer, W.; Heinz, F. (1979): Rapid diagnosis of tick-borne encephalitis by means of enzyme linked immunosorbent assay. In *The Journal of general virology* 42 (3), pp. 505–511. DOI: 10.1099/0022-1317-42-3-505.

Hofmann, H.; Heinz, F. X.; Dippe, H. (1983): ELISA for IgM and IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus: quantification and standardization of results. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie = International journal of microbiology and hygiene. A, Medical microbiology, infectious...* 255 (4), pp. 448–455.

Mansfield, Karen L.; Horton, Daniel L.; Johnson, Nicholas; Li, Li; Barrett, Alan D. T.; Smith, Derek J. et al. (2011): Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. In *The Journal of general virology* 92 (Pt 12), pp. 2821–2829. DOI: 10.1099/vir.0.031641-0.

Niedrig, M.; Vaisviliene, D.; Teichmann, A.; Klockmann, U.; Biel, S. S. (2001): Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. In *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 20 (3), pp. 179–182.

Robert Koch Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 17/2011.

Robert Koch-Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 21/2015.

Roggendorf, M. (1990): Frühsommer-Meningoenzephalitis. Wer soll geimpft werden? In *Therapiewoche* 40, pp. 1173–1178.

Roggendorf, M.; Heinz, F.; Deinhardt, F.; Kunz, C. (1981): Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of antibodies of the IgM class. In *Journal of medical virology* 7 (1), pp. 41–50.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

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

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulación / Placa de Microtitulação
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
CAL	Standard or Calibrator A-E / Standard oder Kalibrator A-E / Standard o Etalon A-E / Standard o Calibratore A-E / Estándar o Calibrador A-E/ Standard ou Calibrador A-E
DIL G	IgG Sample Dilution Buffer / IgG-Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution D'échantillon IgG / Tampone di Diluizione del Campione IgG / Tampón de Dilución de Muestras IgG / Tampão de Diluição de Amostra IgG
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada/ Solução de Bloqueio
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución de Sustrato de TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone de Lavaggio concentrazione x20 / Tampón de Lavado concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

TBE/FSME IgG ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E	Sample (diluted 1+100)
Standard A	-	100 µL	-	-	-	-	-
Standard B	-	-	100 µL	-	-	-	-
Standard C	-	-	-	100 µL	-	-	-
Standard D	-	-	-	-	100 µL	-	-
Standard E	-	-	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer							
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer							
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25°C) in the dark							
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)							



NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
 63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
 Email: info@NovaTec-ID.com
 Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629