

# HAV-Antigen ELISA

Enzymimmunoassay zum Nachweis des

## Hepatitis A-Virus Antigen

**Nur zu Forschungszwecken!**  
**Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

 : Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany  
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10  
E-Mail: [contact@mediagnost.de](mailto:contact@mediagnost.de) • <http://www.mediagnost.de>

## **Inhaltsverzeichnis :**

VERWENDUNGSZWECK	4
GRUNDLAGEN	4
TESTPRINZIP	5
INHALT DER TESTPACKUNG	6
LAGERUNG DER MATERIALIEN	7
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	7
SICHERHEITSHINWEISE	8
TESTVORBEREITUNG	10
PROBENVORBEREITUNG	13
TESTDURCHFÜHRUNG	13
ERGEBNISSE	15
EINSCHRÄNKUNGEN UND TESTCHARAKTERISTIK	18
KURZANLEITUNG	20

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI  
Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/  
Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/  
Symbolit  
according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυρπæν/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sá respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Тootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógovú číslo/ Objednací číslo/Kataložen nomer/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazénar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilítada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsatt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnému světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojava auringonvalolta

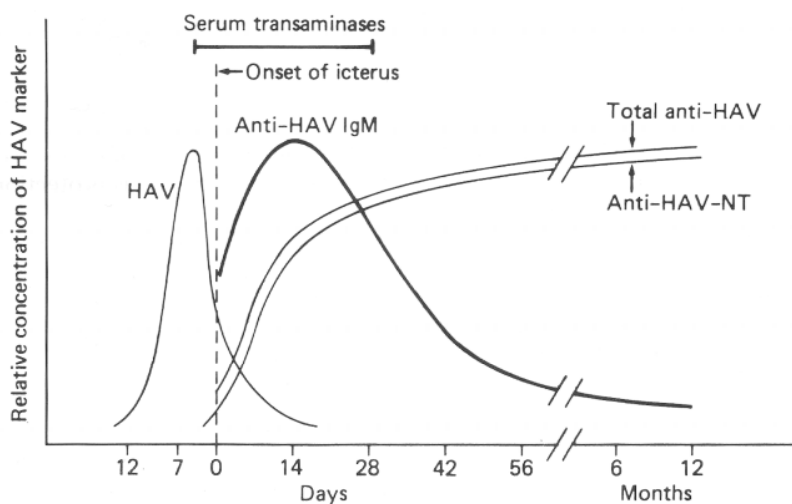
**Nur zu Forschungszwecken.**  
**Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.**  
**Nur zum In-vitro-Gebrauch.**  
**Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.**  
**Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!**

## VERWENDUNGSZWECK

Der Mediagnost HAV-ANTIGEN ELISA ist ein Enzymimmunoassay **für Forschungszwecke** zum Nachweis des Hepatitis A-Virus.

## GRUNDLAGEN

Ein positiver Nachweis des Hepatitis A-Virus (HAV) im Stuhl von Patienten beweist eine frische Infektion mit dem Hepatitis A-Virus. Die Virusausscheidung beginnt etwa 2 Wochen vor der ikterischen Krankheitsphase und erreicht ihren Höhepunkt etwa eine Woche vor Ikterusbeginn. Mit Beginn der ikterischen Phase fällt die Virusausscheidung stark ab; das Virus kann jedoch auch in der ersten bis zweiten Woche nach Ikterusbeginn in geringen Konzentrationen im Stuhl einiger Patienten nachgewiesen werden.



Ein Nachweis des Hepatitis A-Virus ist mit dem Mediagnost HAV-Antigen ELISA auch in anderen Proben möglich, beispielweise in Zelllysaten infizierter Zellen sowie in Zellkulturüberständen. Bei geringen Konzentrationen empfiehlt sich eine Konzentrierung z.B. durch Tangential-Flow- oder Ultrafiltration.

Proben mit stark saurem oder basischem pH-Wert, hohen Salzkonzentrationen und Proben, die Detergentien enthalten, müssen vor dem Test gegen PBS dialysiert werden.

## **TESTPRINZIP**

Die Proben werden in die Vertiefungen einer Testplatte gegeben, die mit einem Antikörper gegen das Hepatitis A-Virus beschichtet sind. In der Probe vorhandenes HAV-Antigen bindet an diesen Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit der Probe (2 Stunden bei 37 °C) wird die Testplatte gewaschen.

Das gebundene HAV-Antigen wird mit Hilfe des zugegebenen Anti-HAV-Peroxidasekonjugats nachgewiesen. Nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit (2 Stunden bei 37 °C) wird die Testplatte gewaschen und eine Substratlösung zugegeben. Bei HAV-Antigen positiven Proben wird das Substrat zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet. Dabei schlägt die blaue Farbe nach gelb um. Anschließend wird die Farbintensität photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die Stärke der Farbreaktion ist proportional zur Menge des Antigens in der Probe. HAV-positive Ergebnisse bei Stuhlproben müssen mit dem beigefügten neutralisierenden Antikörper gegenüber falsch positiven Stuhlproben, die

zuweilen vorkommen, in einer parallelen oder zweiten Bestimmung bestätigt werden.

## **INHALT DER TESTPACKUNG**

1) **Testplatte:**

1 Testplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Reaktionskammerstreifen mit jeweils 8 Vertiefungen aufgeteilt ist. Die Platte ist mit Antikörpern gegen das Hepatitis A-Virus vorbeschichtet.

2) **Antikörperkonjugat (Flasche A):**

1 Fläschchen (**150 µl**) Konjugat, Peroxidase konjugiertes Anti-HAV IgG, 100-fach konzentriert.

3) **Positive Kontrolle (Flasche B):**

1 Fläschchen (**500 µl**) positive Kontrolle. Hepatitis A-Virus Antigen, inaktiviert, gebrauchsfertig.

4) **Neutralisierendes Serum (Flasche C):**

1 Fläschchen anti HAV-positives Humanserum (**500 µl**), 10-fach konzentriert.

5) **Verdünnungspuffer (Flasche D):**

1 Fläschchen (**120 ml**) Verdünnungspuffer für Proben, neutralisierendes Serum und Konjugat, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.

6) **Substrat (Flasche E):**

1 Fläschchen (**12 ml**), gebrauchsfertig.

7) **Stopplösung (Flasche F):**

1 Fläschchen (**12 ml**) Stopplösung. 0,2 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig.

8) **Waschpuffer (Flasche G):** 1 Fläschchen (**50 ml**)  
Waschpuffer, 20-fach konzentriert. Achtung:

Endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4-Wochen haltbar, nur nach Bedarf ansetzen.

9) **Klebefolie** zum Abkleben der Streifen der Testplatte (2x)

### **LAGERUNG DER MATERIALIEN**

Alle Materialien des Testkits müssen bei 2 - 8 °C lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die nicht benützten Reaktionskammerstreifen der Testplatte sind zusammen mit dem beigelegten Trockenkissen luftdicht verschlossen bei 2 - 8 °C zu lagern.

Testpackungen sind bei trockener Lagerung bei 2 - 8°C verwendbar bis zum angegebenen Datum (siehe Etikett). Bei sachgemäßer Handhabung ist die Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung nicht beeinträchtigt.

### **ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN**

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Inkubator

Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader") Filter bei 450 und  $\geq 590$  nm

Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben.

## SICHERHEITSHINWEISE

Die positive Kontrolle enthält inaktiviertes Antigen, das im Restinfektiositätstest auf HAV negativ war. Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden aus menschlichem Blut hergestellt. Die Spenden wurden separat auf HBsAg, HCV, HIV und TPHA getestet. Alle Spenden erwiesen sich als negativ. Da kein Test die Übertragung von Infektionskrankheiten ausschließen kann, müssen alle Reagenzien so behandelt werden, als enthielten sie infektiöses Material.

Nicht mit dem Mund pipettieren. Während der Handhabung der Proben und der Testdurchführung Einmalhandschuhe tragen. Bei Kontaminationen muss die kontaminierte Fläche zunächst mit saugfähigem Material trocken gewischt werden. Danach muss mit einem geeigneten Desinfektionsmittel desinfiziert werden.

Alle Einmalmaterialien sind als infektiöser Abfall zu betrachten. Alle wiederverwendbaren Geräte sind zu desinfizieren.

Die Reagenzien **A, B, C, D** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%)

### **2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution**

- R34 Verursacht Verätzungen
- R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und – handschuhe tragen.
- S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen



Die Reagenzien **A, B, C, D, G** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) (w/w)

**5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one**

- R36/38 Reizend für Augen und Haut  
R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen  
S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen  
S28.1 Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

**Substratlösung (E)**

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

- R20/21/R22 Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken  
R36/37/38 Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem  
S26 Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen  
S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

**Stopplösung (F)**

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

- R36/38 Reizt die Augen und die Haut  
S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.  
S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

### Erste-Hilfe Maßnahmen:

*Nach Hautkontakt:* Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

*Nach Augenkontakt:* Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

*Nach Verschlucken:* Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

## **TECHNISCHE HINWEISE**

**Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.**

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µl betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusseIndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwungvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusseIndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

## TESTVORBEREITUNG

- 1) Alle Reagenzien und die Testplatte müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden.
- 2) **Waschpuffer (G)**: Der 20-fach konzentrierte Waschpuffer wird 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Der gebrauchsfertig **verdünnte Waschpuffer G** ist nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
- 3) Zur Bestätigung positiver Reaktionen wird das **neutralisierende Serum (C)** 1:10 mit **Verdünnungspuffer (D)** verdünnt eingesetzt. Dabei sollte nur die jeweils benötigte Menge angesetzt werden (50 µl pro Einzelmessung). Das verdünnte Serum ist mindestens eine Woche bei 4°C stabil.
- 4) Das **Konjugatkonzentrat (A)** wird 1:100 mit Verdünnungspuffer **(D)** verdünnt. Dabei sollte nur die jeweils benötigte Menge angesetzt werden (100 µl pro Einzelmessung). Die Konjugatgebrauchslösung ist mindestens eine Woche bei 4 °C haltbar.

## PROBENVORBEREITUNG

Von der zu untersuchenden Stuhlprobe wird eine 20 %-ige (w/v) Suspension in Verdünnungspuffer (**D**) hergestellt. Die Suspension wird 10 Minuten bei 2400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der klare Überstand kann jetzt im HAV-Antigen ELISA eingesetzt werden. Bei Bedarf ein zweites Mal zentrifugieren.

Zellkulturüberstände oder Zellysate können direkt im Test eingesetzt werden. Gegebenenfalls muss HAV aufkonzentriert werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

- 1) **Untersuchung von Stuhlsuspensionen und sonstigen Proben:** Bei jedem Testansatz sind neben den Proben **negative und positive Kontrollen** mitzuführen. Zur Bestätigung positiver Ergebnisse müssen die Proben und positive Kontrollen unter neutralisierenden Bedingungen getestet werden. Allgemein sind Doppelbestimmungen zu empfehlen, insbesondere bei den Kontrollen

Alle benötigten Reagenzkammerstreifen werden entweder mit je **50 µl Verdünnungspuffer (D)** oder mit je **50 µl neutralisierendem Verdünnungspuffer (1:10 Verdünnung des neutralisierenden Serums (C))** pro Vertiefung beladen.

Als negative Kontrollen werden je **50 µl Verdünnungspuffer (D)**, als positive Kontrollen je **50 µl des HAV-Antigens (B)** dazu pipettiert. Von den zu untersuchenden **Stuhlsuspensionen oder Proben**

werden ebenfalls **je 50 µl** zupipettiert, sodass in jeder Vertiefung 100 µl Flüssigkeit vorliegen.

- 2) Die Reaktionskammern werden mit Klebefolie verschlossen und **2 Stunden bei 37°C** inkubiert.
- 3) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben abgesaugt und die Vertiefungen **3 x** mit je **300 µl Waschlösung (G)** pro Vertiefung gewaschen (Einwirkdauer des Waschlösung ca. 10 sec. je Waschlösungsschritt).
- 4) In jede Vertiefung werden je **100 µl Konjugat-lösung (A)** pipettiert, die Reaktionskammern mit Klebefolie verschlossen und **2 Stunden bei 37°C** inkubiert.
- 5) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Vertiefungen der Reaktionskammerstreifen **3 x** mit je **300 µl Waschlösung (G)** pro Vertiefung gewaschen (Einwirkdauer des Waschlösung ca. 10 sec. je Waschlösungsschritt).
- 6) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung (E)** pipettiert und **30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25°C)** inkubiert.
- 7) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung (F)** dazu pipettiert.
- 8) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt bei **450 nm**, (**Referenzfilter ≥ 590 nm**).

## **ERGEBNISSE**

Von den negativen Kontrollen, den positiven Kontrollen und den Proben sind jeweils die Mittelwerte zu bilden. Der Wert der negativen Kontrolle wird als Leerwert von allen Messwerten abgezogen. Bei den meisten Messgeräten kann dies automatisch mit der Nullwertkorrektur (Blank) erreicht werden.

Die Differenz zwischen dem Mittelwert der Extinktion der positiven Kontrolle und der negativen Kontrolle soll mindestens 0,5 OD betragen.

Die durch neutralisierendes Serum bedingte Extinktionsabnahme der positiven Kontrolle muss mindestens 80 % betragen.

Der Grenzwert (cut-off) beträgt 10 % (= 1/10) des Extinktionsmittelwertes der positiven Kontrolle. Proben mit Extinktionen im Bereich 10 bis 15% der positiven Kontrolle liegen im Graubereich. Der Test sollte wiederholt werden. Bei gleichem Ergebnis ist die Probe als positiv einzustufen. Proben, deren Extinktionsmittelwerte größer als der Graubereich sind, sind als positiv zu bewerten.

Die positive Beurteilung trifft nicht zu, wenn der Wert der HAV-Neutralisation der Probe nicht mindestens um 25 % vom normalen Messwert reduziert ist.

Proben, deren Messwerte über dem der positiven Kontrolle liegen und die durch Neutralisation um weniger als 25 %

reduziert werden, müssen verdünnt erneut getestet werden. Die Verdünnung 1:10 in Verdünnungspuffer wird empfohlen.

Negative Probenwerte (Extinktion nach Abzug des Leerwertes) können vorkommen.

**Beispiel :**

Extinktion positive Kontrolle 1 : 1,114  
Extinktion positive Kontrolle 2 : 1,162  
Mittelwert positive Kontrolle:  $(1,114 + 1,162) : 2$   
 $= 1,138$

Extinktion negative Kontrolle 1 : 0,024  
Extinktion negative Kontrolle 2 : 0,030  
Mittelwert negative Kontrolle :  $(0,024 + 0,030) : 2$   
 $= 0,027$

Abzug des Wertes der negativen Kontrolle von allen Messwerten:

Positive Kontrolle:  $1,138 - 0,027 = 1,111$

Berechnung des Grenzwertes und des Graubereichs:

Extinktion positive Kontrolle x 10%:  $1,111 \times 0,10$   
 $= 0,111$

Extinktion positive Kontrolle x 15%:  $1,111 \times 0,15$   
 $= 0,166$



Alle Proben, deren Mittelwert der Extinktionen größer oder gleich 0,166 ist, sind als positiv zu bewerten, sofern die Extinktion der positiven Kontrolle nach Neutralisation um mindestens 80 % und die der Probe um mindestens 25 % reduziert ist. Proben mit Extinktionen zwischen 0,111 und 0,166 sollten wiederholt werden, wenn eine 25%ige Reduktion durch Neutralisation erreicht wird.

## **EINSCHRÄNKUNGEN UND TESTCHARAKTERISTIK**

Die Bestandteile der Test-Packung sind nur zum in-vitro-Gebrauch.

Proben, deren Messwerte über dem der positiven Kontrolle liegen und die durch Neutralisation um weniger als 25 % reduziert werden, müssen verdünnt erneut getestet werden.

### Sensitivität:

Im Test negative Proben können dennoch HAV-Partikel enthalten, die mit empfindlicheren Methoden erfasst werden können. Die Sensitivität gegenüber HAV-PCR beträgt 53%. Die Infektiosität solcher Proben ist nicht gesichert.

### Richtigkeit/Vorhersagewert:

Im Test positive Proben sind zu 91% auch mit HAV-PCR nachweisbar.

### Präzision:

Die Variation der Messwerte um den cut-off beträgt etwa 16%.

Proben mit Extinktionen im Bereich von 10 bis 15% der positiven Kontrolle liegen im Graubereich. Der Test sollte wiederholt werden.

Kreuzreaktionen sind nicht bekannt.



## KURZANLEITUNG

Reagenzpräparation:	Verdünnung:
Konjugatkonzentrat A	<b>1:100</b> mit <b>Verdünnungspuffer D</b> Nur die jeweils benötigte Menge ansetzen.
Neutralisierendes Serum C	<b>1:10</b> mit <b>Verdünnungspuffer D</b> Nur die jeweils benötigte Menge ansetzen.
Waschpuffer G	<b>1:20</b> mit <b>Aqua dest.</b>
Stuhlproben	<b>20%-ige (w/v)</b> Suspension in <b>Verdünnungspuffer D</b> herstellen, zentrifugieren <b>10 min, 2400 x g</b> bei <b>RT</b> . Der klare Überstand wird im Test eingesetzt.

### Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipetieren	Reagenzien	Position
50 µl	Verdünnungspuffer <b>D</b> oder neutralisierender Verdünnungspuffer (1:10 Verdünnung des neutralisierenden Serums <b>C</b> ) vorlegen	In alle benötigte Vertiefungen
50 µl	Verdünnungspuffer <b>D</b> (Negativ-Kontrolle)	A1/2
50 µl	HAV-Antigen <b>B</b> (Positiv-Kontrolle)	B1/2
50 µl	Proben	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen abdecken.		
<b>Inkubation: 2 h bei 37°C</b>		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte mit <b>300 µl</b> Waschpuffer <b>G</b> / Vertiefung <b>dreimal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	Konjugatgebrauchslösung <b>A</b>	in jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen abdecken.		
<b>Inkubation: 2 h bei 37°C</b>		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte mit <b>300 µl</b> Waschpuffer <b>G</b> / Vertiefung <b>dreimal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung <b>E</b>	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 30 min im Dunkeln bei RT</b>		
100 µl	Stopplösung <b>F</b>	in jede Vertiefung
Messung innerhalb von <b>30 min</b> bei <b>450 nm</b> (Referenzfilter <b>≥590 nm</b> ).		