

anti- Pseudomonas aeruginosa IgG ELISA

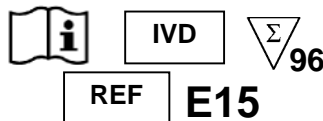
Enzymimmunoassay für die qualitative und quantitative Bestimmung von
humanen Antikörpern gegen **Pseudomonas aeruginosa**
Deutsch

Enzyme Immunoassay for qualitative and quantitative Determination of
human antibodies against **Pseudomonas aeruginosa**
English

Europäische Union / European Union*:
für In-vitro-Diagnostik / for in-vitro diagnostics
Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal! / Only for professional use!
Rest of the world and USA***: for research use only!

CE

DE/CA40/00809/7



mediagnost[®]

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 • <http://www.mediagnost.de>

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/ Symbody/ Symbody/ [icon] Sümbolid/ [icon] 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/ Aegumiskuupäev/ 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/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo! / Lue käyttöohje huolellisesti!



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use)/ in vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo médico per diagnostica in vitro (per uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určený na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-numår lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellert von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ 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/Каталожен номер/Теллімісnumber/ 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/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittä temperaturid/ 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/ Indeholder 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/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνετή departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta



Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubationstijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika



incubate at / Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/Inkubácia pri/ Inkubace při/Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita



Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy



Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte



Conjugate Concentrate / Konjugatkonzentrat/ conjugué conc / Coniugato concentrato / Conjugado concentrado / Konjugado Concentrado / conjugaat geconcentreerd / konjugat koncentrat/ konjugat koncentrat/ konjugat koncentrat / Koniugat koncentrátum / Antitest és enzim páros/ konjugát/ конюгат Концентрат / konjugaat konsentraat /

		Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Concentrat Compuși / Koncentrat konjugat / konjugaattiviiviste Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampono X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späd i buffert X/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Redit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Iaimennetaan x puskuriin
DILU X	VP	
Control	KS	Control Serum / Kontrollserum/- Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
Control POS	PK1, PK2, PK3	Control Serum + / Kontrollserum + / Contôle sérique +/ Siero di controllo +/ Suero de control +/ Soro de Controlo +/ controleserum +/ Kontrolserum +/ Kontrollserum +/ Serum kontrolne +/ Ellenőrző szérum +/ Kontrolné sérum +/ Kontrolní sérum +/ Контролен серум +/ Kontrollseerum +/ Ορός ελέγχου +/Ser de control +/ Kontrolni serum +/ Kontrolli seerumi +
Control NEG	NK	Control Serum - / Kontrollserum - / Contôle sérique -/ Siero di controllo -/ Suero de control -/ Soro de Controlo -/ controleserum -/ Kontrolserum -/ Kontrollserum -/ Serum kontrolne -/ Ellenőrző szérum -/ Kontrolné sérum -/ Kontrolní sérum -/ Контролен серум -/ Kontrollseerum -/ Ορός ελέγχου -/Ser de control -/ Kontrolni serum -/ Kontrolli seerumi -
WASHBUF 20x	WP	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnege pufru/ Pesuliuosiitiviste
WASHBUF		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraatiliuos
H₂SO₄	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stoppløsning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопираци разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE		Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytke/ Tányér leragsztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Пластика с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerklēplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevyn oheisella teipillä
MEASURE		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merat' 30 minut pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)./ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)./ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)./ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm) / Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur		Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatura/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description		International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End		in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkii tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
--	---

Packungsbeilage

Deutsch

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN	5
EINFÜHRUNG	5
ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK	6
ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	6
PROBEN: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	7
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	8
TECHNISCHE HINWEISE	8
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
TESTDURCHFÜHRUNG	9
AUSWERTUNG	10
Qualitative Bestimmung:	10
Semi-quantitative Bestimmung:	11
Bewertung	11

Package Insert

English

TECHNICAL FEATURES	15
INTRODUCTION	15
TEST PRINCIPLE	15
INTENDED USE	16
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	16
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	17
REAGENTS PROVIDED	17
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	18
TECHNICAL NOTES	18
STORAGE CONDITIONS	18
WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
ASSAY PROCEDURE	20
CALCULATION OF RESULTS	20
Qualitative Calculation:	20
Semi-quantitative calculation	21
LITREATURE / LITERATUR	24
KURZANLEITUNG – Mediagnost P. aeruginosa EIA E15	25
SUMMARY – MEDIAGNOST P. aeruginosa IgG EIA E15	27

* please ask for package inserts in your national language

** please ask for special package insert

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN

- ◆ Antikörper gegen: Elastase, Exotoxin A und alkalische Protease
- ◆ hohe Sensitivität und Spezifität
- ◆ geringe Inter- und Intraassay Varianz

EINFÜHRUNG

Pseudomonas aeruginosa, ein Gram-negatives Bakterium, das ubiquitär in Feuchtreservoirien unserer Umgebung vorkommt, verursacht ca. 10% aller nosokomialen Infektionen. Der opportunistisch-pathogene Erreger führt zu akuten und chronischen Infektionstypen in verschiedenen Organen suszeptibler Patientengruppen. Chronische Lungeninfektionen bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) sind sehr häufig, können in frühester Kindheit auftreten und bestimmen die Lebenserwartung dieser Patienten. Die *P. aeruginosa* Infektion verursacht einen schnellen Anstieg von Antikörpern gegen eine große Zahl von *P. aeruginosa* Antigenen in CF Patienten. Unser sensitives Antikörperdetektionssystem diskriminiert zwischen infizierten und nicht-infizierten Patientengruppen, entdeckt sehr frühzeitig den Beginn einer *P. aeruginosa* Infektion wenn mikrobiologische Informationen über den Erreger nicht erhältlich sind und zeigt die Chronizität der Infektion durch hohe spezifische Antikörpertiter an. Dadurch erlaubt der Test die Durchführung einer anti-*Pseudomonas* Chemotherapie schon kurz nach Infektionsbeginn und kann ebenso zur Kontrolle der Effizienz einer Antibiotikatherapie herangezogen werden. Durch die Verwendung dreier *P. aeruginosa* Antigene, die hochgradig immunogen und in nahezu allen *P.aeruginosa*-Stämmen vorhanden sind, sowie durch die hohe Sensitivität des Tests, sind falsch-negative wie falsch-positive Ergebnisse nahezu ausgeschlossen. Dieser ELISA ist eine Weiterentwicklung eines Radioimmunoassays, der mehr als 10 Jahre erfolgreich in der Diagnose von *P. aeruginosa* Infektionen bei CF-Patienten und anderen Patientengruppen verwendet wurde.

Bei der semi-quantitativen Analyse von Patientenseren mit dem **mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA, E15**, gelten folgende Bewertungen:

Titer	Bewertung
< 1:500	unauffällig
1:500 bis 1: 1.250	grenzwertig
> 1:1.250	positiv
> 1:10.000	chronisch positiv

Je nach Erregerstamm und Immunantwort des Patienten können Antikörper gegen einzelne oder auch alle drei Antigene gleichzeitig festgestellt werden. Ein Patient ist seropositiv wenn das Serum auf ein oder mehrere Antigene positiv reagiert. Bei akut und auch chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten kann bei Immuninsuffizienz die Bewertung über den Antikörpertiter unzureichend ausfallen.

ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK

Der mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA, E15, ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern in humanem Serum gegen die extrazellulären Proteine alkalische Protease, Elastase und Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*.

ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

Verdünnte Seren werden in die Vertiefungen der Testplatten pipettiert, die mit den *P. aeruginosa* Antigenen **alkalische Protease (AP)**, **Elastase (Ela)** und **Exotoxin A (Exo)** beschichtet sind. Die spezifischen Antikörper der Seren werden gebunden. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei 37°C werden die Testplatten gewaschen und die Antikörper mit Peroxidase konjugierten anti-IgG-spezifischen Antikörpern (Konjugat) markiert (Inkubationszeit 2 Stunden bei 37°C). Nach erneutem Waschen wird das Substrat zugegeben, das vom Konjugat zu einem dunkelblauen Farbstoff umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet, dabei schlägt die dunkelblaue Farbe nach Gelb um. Die Farbreaktion wird photometrisch gemessen und ausgewertet. Die Farbintensität korreliert mit der Antikörper Konzentration in der Probe.

Tabelle 1: Verdünnungslinearität

Verdünnung:	Probe 1		
	AP	Ela	Exo
1:750	1445		3623
1:1000	1429		3846
1:1500	1371		4123
1:3000	1162	10893	4230
1:6000		11135	4375
1:12000		10905	4590

Tabelle 2 : Inter-Assay-Varianz

	Anzahl	Mittelwert (Titer)			Standardabweichung			VK (%)		
		AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo
Probe 1	74	1041	958	806	66	60	76	6	6	9
Probe 2	73	1516	1662	1167	77	135	74	5	8	6
Probe 3	72	3031	4129	4566	147	306	303	5	7	7

Tabelle 3: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl	Mittelwert (Titer)			Standardabweichung			VK (%)		
		AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo
Probe 1	16	3858	5521	5673	173	135	127	4,47	2,45	2,25
Probe 2	16	1453	1530	1381	88	44	142	6,08	2,86	10,29

KLINISCHE VALIDIERUNG

Die klinische Validierung erfolgte durch das Hygiene Institut der Universität Tübingen Prof. Dr. Döring. Im Vergleich zum mikrobiologischen Nachweis zeigte sich bei 104 Proben, davon 52 positiv und 52 negativ im mikrobiologischen Nachweis, eine 100% Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Mediagnost E15. Neuere Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität wurden von Kappler, M et al. Thorax published online 31 Jan 2006; doi:10.1136/thx.2005.049536 unter dem Titel: Diagnostic and Prognostic Value of Serum Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis publiziert.

PROBEN: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Uneingeschränkt geeignet sind Serumproben. Leichte Hämolyse der Proben stört die Bestimmung nicht. Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (5x) haben in unseren Versuchen jedoch keine Auswirkungen gehabt. Für die meisten Untersuchungen) sollte eine **Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer VP geeignet** sein. Sollten die Extinktionen der Proben die Extinktion der Positivkontrolle überschreiten muss die Messung mit einer stärker verdünnten Probe wiederholt werden. Um ein valides Titerergebnis zu erhalten sollte die Probe in drei Verdünnungsstufen bestimmt werden (1:1.000; 1:10.000 und 1:100.000).

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

90 µl **Verdünnungspuffer VP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **10 µl Serum-** oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:10 verdünnt) und **mischen**.

Im zweiten Schritt sollten die vorverdünnten Proben dann wie folgt seriell verdünnt werden:

10µl (1:10) Verdünnung in 990µl VP	1:1.000
100µl (1:1000) Verdünnung in 900µl VP	1:10.000
100µl (1:10000) Verdünnung in 900µl VP	1:100.000

Nach dem Mischen bitte innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung **100 µl pro Bestimmung** im Assay einsetzen (Pipettierkontrolle = Blaufärbung der Lösung in der Mikrotiterplattenvertiefung).

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	<input type="checkbox"/> MTP AP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit alkalischer Protease beschichtet und rot markiert .
2)	<input type="checkbox"/> MTP ELA	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit Elastase beschichtet und blau markiert.
3)	<input type="checkbox"/> MTP EXO A	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit Exotoxin A beschichtet und grün markiert.
4)	<input type="checkbox"/> BUF VP	Verdünnungspuffer VP , 3 × 50 ml, gebrauchsfertig, bitte zur Verdünnung der Proben und des Konjugatkonzentrats KK verwenden.
5)	<input type="checkbox"/> Control POS PK1	Positivkontrolle PK1 , 1,5 ml, gebrauchsfertig, kalibriertes Kontrollserum für alkalische Protease AP rot markiert mit einem Titer von 1:2500
6)	<input type="checkbox"/> Control POS PK2	Positivkontrolle PK2 , 1,5 ml, gebrauchsfertig, kalibriertes Kontrollserum für Elastase ELA blau markiert mit einem Titer von 1:2500
7)	<input type="checkbox"/> Control POS PK3	Positivkontrolle PK3 , 1,5 ml, gebrauchsfertig, kalibriertes Kontrollserum für Exotoxin A Exo grün markiert mit einem Titer von 1:2500
8)	<input type="checkbox"/> Control NEG NK	Negativkontrolle NK , 2 × 1,5 ml, gebrauchsfertig, nicht reaktiv für Pseudomonas aeruginosa Antigene
9)	<input type="checkbox"/> Control	Kontrollserum KS , 2 × 1,5 ml, gebrauchsfertig, enthält humanes Serum und muss im Test als grenzwertig bestimmt werden
10)	<input type="checkbox"/> CONJ	Konjugatkonzentrat KK , 2 × 250 µl, 100fach Konzentrat, enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes anti-human IgG. Verdünnte Konjugatgebrauchslösung ist nur begrenzt haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
11)	<input type="checkbox"/> WASHBUF 20x	Waschpuffer WP , 120 ml, 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. 100 ml im Standzylinder auf 2000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
12)	<input type="checkbox"/> SUBST	Substrat S , 33 ml, gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
13)	<input type="checkbox"/> H ₂ SO ₄	Stopplösung SL , 33 ml, gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
14)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 6 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP
 Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
 Vortex-Mischgerät
 Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

TECHNISCHE HINWEISE

Für die Verdünnung des **Konjugatkonzentrats KK** wird der **Verdünnungspuffer VP** verwendet. Verdünnte Konjugatgebrauchslösung ist nur begrenzt haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** bei 2° - 8°C zu lagern.

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

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 μ l 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 fuselndem 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 schwingvolles 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 fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Bei der **Testdurchführung** sollten Positivkontrolle, Negativkontrolle, Kontrollserum **KS** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das verdünnte Konjugatkonzentrat **KK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung **SL** in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **KS, PK, NK**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

Die Reagenzien **KK, VP, WP** 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

Die Reagenzien **KK, VP** 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

Substratlösung (S)

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 (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

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.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Messungen (Kontrolle und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

- 1) In die Positionen* A1/2 je **100 µl Negativkontrolle NK** geben, sowie
- 2) in die Positionen* B1/2 je **100 µl Positivkontrolle PK (entsprechend PK1,PK2 ODER PK3)**
- 3) in die Positionen* C1/2 je **100 µl Kontrollserum KS**
*der Mikrotiterplatten (PL1/PL2/PL3)
- 4) In die restlichen Vertiefungen können je **100 µl der verdünnten Proben** (i.a., 1:1000 in Probenpuffer **VP** verdünnt) pipettiert werden.
- 5) Die Vertiefungen der Platten werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunden** bei **37°C** inkubiert.

- 6) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platten mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **dreimal** gewaschen.
- 7) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl** des in VP 1:100 verdünnten **Konjugatkonzentrats KK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 8) Die Vertiefungen der Platten werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunde** bei **37°C** inkubiert.
- 9) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platten wie in Schritt 6) beschrieben gewaschen
- 10) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 11) Die Platten werden **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 12) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.

Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)**.

AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgt für jedes Antigen (jede Platte) gesondert. Von allen Mehrfachwerten sind die Mittelwerte zu bilden.

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass **die Extinktionen der Negativ Kontrollen NK 0,25 Einheiten nicht überschreiten**. Die **Differenz der Extinktionen der Negativ Kontrollen NK sowie der jeweiligen Positiv Kontrollen PK sollte mindestens 0,6 Einheiten betragen**.

Je nach Erregerstamm und Immunantwort des Patienten können Antikörper gegen einzelne oder auch alle drei Antigene gleichzeitig festgestellt werden. Ein Patient ist seropositiv wenn das Serum auf ein oder mehrere Antigene positiv reagiert. Bei akut und auch chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten kann bei Immunsuffizienz die Bewertung über den Antikörpertiter unzureichend ausfallen.

Qualitative Bestimmung:

Der Mittelwert der negativen Kontrolle ist von allen Messwerten abzuziehen (Blank)

Der **Grenzwert** (cut-off) beträgt 20% des Extinktionswertes der positiven Kontrolle (PK). Er entspricht dem Messwert eines 1:1.000 verdünnten Serums mit Titer 1:500. 1:1.000 verdünnte Seren mit geringeren Messwerten sind als negativ einzustufen.

Der **grenzwertige Bereich** geht von 20% bis 50% des Extinktionswertes der positiven Kontrolle (PK). Messwerte in diesem Bereich sind als grenzwertig einzustufen. 1:1.000 verdünnte Seren mit Messwerte über diesem Bereich gelten als positiv.

Beispiel:

Beispiel für die Auswertung:

Negative Kontrolle NK		Extinktion
1.Wert		0,041
2.Wert		0,056
Mittelwert		0,049

Positive Kontrolle PK		Extinktion
1.Wert		1,120
2.Wert		1,136
Mittelwert		1,128

Berechnung:

PK – NK	:1,128 – 0,049	= 1,079
Cutoff (20% von PK-NK)	:0,2 × 1,079	= 0,216
Grenzwert (50% von PK-NK)	:0,5 × 1,079	= 0,540

Alle Proben mit einer Extinktion < 0,216 sind damit bzgl. des Gehaltes an anti-P. aeruginosa IgG als negativ anzusehen.

Proben mit einer Extinktion von > 0,216 und < 0,540 werden als grenzwertig beurteilt und Proben mit einer Extinktion von > 0,540 als positiv bzgl. des Gehaltes an anti-P. aeruginosa IgG.

Semi-quantitative Bestimmung:

Die Auswertung erfolgt graphisch oder über ein entsprechendes Auswertprogramm.

Die Extinktionen der negativen (NK) und positiven (PK) Kontrolle (y-Achse) werden in einem doppelt linearen Koordinatensystem gegen einen Titer-Faktor, NK = 0 und PK = 2,5 auf der x-Achse eingetragen. Für die Quantifizierung der Serenmesswerte wird eine Gerade durch die Messwerte von NK und PK gelegt und bis Faktor 3,5 verlängert.

Zur Bestimmung des Titers eines Serums wird vom Messwert der Serumprobe über die Gerade NK-PK der Titerfaktor ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor des Serums multipliziert.

Titerfaktoren kleiner als 0,25 und größer als 3,5 (x-Achse) werden bei der Bewertung nicht berücksichtigt!

Ausnahme:

**Titerfaktor einer 1:1.000 Verdünnung < 0,5 = negativ
>3,5 = positiv, muss stärker verdünnt getestet werden.**

Bewertung

Bei der semi-quantitativen Analyse von Patientenseren mit dem **mediagnost anti-Pseudomonas aeruginosa IgG EIA , E15**, gelten folgende Bewertungen:

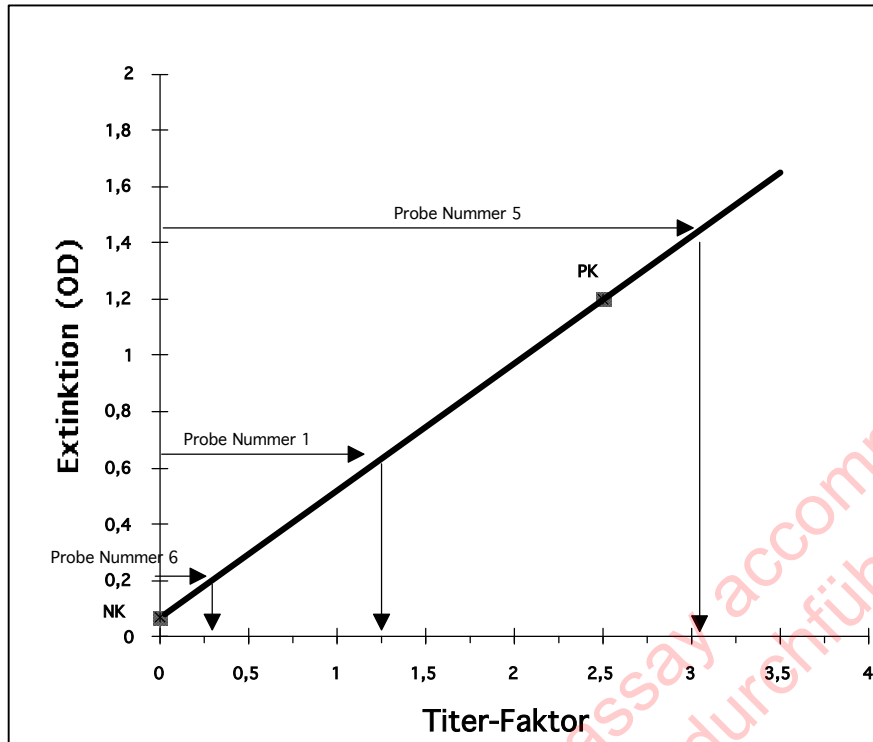
Titer	Bewertung
< 1:500	negativ, unauffällig
1:500 bis 1: 1.250	grenzwertig
> 1:1.250	positiv
> 1:10.000	chronisch positiv

Beispiel für die Auswertung:

Negative Kontrolle NK		Extinktion
1.Wert		0,041
2.Wert		0,056
Mittelwert		0,049

Positive Kontrolle PK		Extinktion
1.Wert		1,220
2.Wert		1,176
Mittelwert		1,198

Graphik



Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

Auswertung

Probe Nr.	Probe Verdünnung	Extinktion (Mittelwert)	Titerfaktor nach Graphik	Titer	Bewertung
Beispiel: Serum grenzwertig					
1	Serum A 1:1.000	0,625	1,25	1:(1.000 x 1,25) => 1: 1.250	grenzwertig
2	Serum A 1:10.000	0,075	< 0,25		wird nicht bewertet
3	Serum A 1:100.000	0,05	< 0,25		wird nicht bewertet
Beispiel: Serum positiv					
4	Serum B 1:1.000	2,82	> 3,5		positiv
5	Serum B 1:10.000	1,45	3,05	1:(10.000 x 3,05) =>1:30.500	chronisch positiv
6	Serum B 1:100.000	0,210	0,3	1:(100.000 x 0,3) => 1:30.000	chronisch positiv
Beispiel: Serum negativ					
7	Serum C 1:1000	0,064	< 0,25	< 1:500	negativ

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES

- ◆ Detects Antibodies against three Antigens Alkaline Protease, Exotoxin A and Elastase
- ◆ high sensitivity and specificity
- ◆ low intra- and interassay variability

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa, a Gram-negative bacterium ubiquitously distributed in the moist environment, causes about 10% of all nosocomial infections. This opportunistic pathogen leads to acute and chronic types of infection within the various organs of susceptible patient groups. Chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis (CF) is very frequent, may start early in infancy and determines the life expectancy of these patients. *P. aeruginosa* infection provokes a rapid production of antibodies to a large number of *P. aeruginosa* antigens in CF patients. **Mediagnost's** sensitive antibody detection system discriminates between infected and uninfected patient groups, detects a *P.aeruginosa* infection very early at the onset, when microbiological information is not yet readily available as seen with very young CF infants and reveals the chronicity of the infection when high specific antibody titres are determined. Thus, the assay may allow the commencement of anti-*Pseudomonas* chemotherapy early after onset of the infection and may also serve as a tool to control the efficiency of antibiotic therapy. Due to the use of three *P.aeruginosa* antigens, which are highly immunogenic and present in different parts from nearly all *P.aeruginosa* strains, together with the high sensitivity of the assay, false-negatives as well as false-positive results are almost impossible. Most patients immune systems react with at least one of the three antigens. The present EIA is a further development of a radioimmunoassay used successfully for more than 10 years in the diagnosis of *P.aeruginosa* infection in CF and other patient groups.

The semi-quantitative detection of human sera using the **mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA , E15**, is subdivided into the following categories:

Titre	Interpretation
< 1:500	negative
1:500 to 1: 1.250	border-line
> 1:1.250	positive
> 1:10.000	chronically positive

Depending on the *Pseudomonas aeruginosa* species and the patient's immune reaction, antibodies can be detected against a single, two or even all three antigens simultaneously. A patient is regarded as sero-positive when the serum is positive for one or more of the antigens. In acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infected patients suffering from immunosuppression, assessment of an infection via the detection of antibodies may be inadequate.

TEST PRINCIPLE

The **Mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA, E15**, is a sandwich enzyme immunoassay. Serum or plasma samples are diluted and added to the wells of a microtiter plate, which have been previously coated with the *Pseudomonas aeruginosa* antigens alkaline protease, elastase or exotoxin A. Specific antibodies in the sample bind to the antigens present during an incubation of 2h at 37°C. After washing, the conjugate (anti-human IgG peroxidase-labelled immunoglobulin) is added and incubated again (for 2 h at 37°C). After a final washing step,

substrate is added and further incubated for 30 min at room temperature. The reaction is terminated on addition of stop solution accompanied by a change from blue to yellow. The absorbance of the coloured reaction product is measured on a microtiter plate reader. The colour intensity of the reaction corresponds to the concentration of antibodies in the sample.

INTENDED USE

The Mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA, E15, is an enzyme immunoassay for qualitative and semi-quantitative detection of IgG-Antibodies in human serum against the extracellular proteins: **Alkaline Protease (AP)**, **Elastase (Ela)** and **Exotoxin A (Exo)** of *Pseudomonas aeruginosa*.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

Table 1 : Linearity

Dilution	Sample		
	AP	Ela	Exo
1:750	1445		3623
1:1000	1429		3846
1:1500	1371		4123
1:3000	1162	10893	4230
1:6000		11135	4375
1:12000		10905	4590

Table 2 : Inter-Assay-Variation

	Number	Mean (Titer)			Standard deviation			Coefficient of Variation (%)		
		AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo
Sample 1	74	1041	958	806	66	60	76	6	6	9
Sample 2	73	1516	1662	1167	77	135	74	5	8	6
Sample 3	72	3031	4129	4566	147	306	303	5	7	7

Table 3: Intra-Assay-Variation

	Number	Mean (Titer)			Standard deviation			Coefficient of Variation (%)		
		AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo	AP	ELA	Exo
Sample 1	16	3858	5521	5673	173	135	127	4.47	2.45	2.25
Sample 2	16	1453	1530	1381	88	44	142	6.08	2.86	10.29

Clinical validation was done by the *Hygiene Institute of the University of Tübingen* Prof. Dr. Döring. In comparison with the microbiological detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum and throat swab specimens the Mediagnost E15 Antibody Assay shows the same results in 104 samples (52 positive and 52 negative in microbiological culture). Recently, sensitivity and specificity were investigated again and published in *Thorax (Kappler, M et al. Thorax published online 31 Jan 2006; doi:10.1136/thx.2005.049536: Diagnostic and Prognostic Value of Serum Antibodies against Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis)*. The results clearly demonstrate the high quality of the Mediagnost Assay.

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Serum samples are suitable. A special external sample preparation prior to assay is not required. Slight hemolysis of the samples doesn't disturb the determination.

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination, store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote).

In most determinations (e.g. Serum or Plasma samples and no extreme values expected) the dilution of **1:1000 with Dilution Buffer VP is suitable**.

If the extinction of a sample exceeds the extinction of the positive control **PK** measurement should be repeated with the more diluted sample. For valid titer results samples should be measured in three dilutions (1:1000, 10000 and 100000).

Suggested Dilution Protocol:

Pipette 90 µl **Dilution Buffer VP** in PE-/PP-tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µl Serum- or Plasma** (dilution 1:10) and mix each tube.

In a second dilution step the pre-diluted samples should be diluted serial as follows:

10µl (1:10) Dilution in 990µl VP	1:1000
100µl (1:1000) Dilution in 900µl VP	1:10000
100µl (1:10000) Dilution in 900µl VP	1:100000

After mixing use **100 µl** of this solution within 1 hour **per determination** in the assay.

REAGENTS PROVIDED

1)	<input type="checkbox"/> MTP AP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with alkaline Protease and labelled red , packed in a laminate bag.
2)	<input type="checkbox"/> MTP ELA	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with Elastase and labelled blue , packed in a laminate bag.
3)	<input type="checkbox"/> MTP EXO A	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with Exotoxin A and labelled green , packed in a laminate bag.
4)	<input type="checkbox"/> BUF VP	Dilution Buffer VP , 3 × 50 ml, ready-to-use, please use for the dilution of the conjugate concentrate KK as well as for the dilution of samples
5)	<input type="checkbox"/> Control POS PK1	Positive Control PK1 , 1.5 ml, ready-to-use, calibrated control serum for alkaline Protease AP red labelled shows a titer of 1:2500
6)	<input type="checkbox"/> Control POS PK2	Positive Control PK2 , 1.5 ml, ready-to-use, calibrated control serum for Elastase Ela blue labelled shows a titer of 1:2500
7)	<input type="checkbox"/> Control POS PK3	Positive Control PK3 , 1.5 ml, ready-to-use, calibrated control serum for Exotoxin A Exo green labelled shows a titer of 1:2500
8)	<input type="checkbox"/> Control NEG NK	Negative Control NK , 2 × 1.5 ml, ready-to-use, contains human serum, not reactive for Pseudomonas aeruginosa antigens
9)	<input type="checkbox"/> Control	Control Serum KS , 2 × 1.5 ml, ready-to-use, contains human serum and has to be determined as borderline in the assay
10)	<input type="checkbox"/> CONJ	Conjugate Concentrate KK , 2 × 250 µl, 100fold Concentrate, contains POD (horseradish-Peroxidase)-labelled anti-human IgG. After dilution the Cojugate is only limited stable, dilute only according to requirements.
11)	<input type="checkbox"/> WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP) , 120 ml, 20 X concentrated solution. Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use. Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
12)	<input type="checkbox"/> SUBST	Substrate (S) , 33 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
13)	<input type="checkbox"/> H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL) , 33 ml, ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
14)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 6 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)
Vortex-mixer
Microtiter plate washer (recommended)
Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm
Polyethylen PE/Polypropylen PP tubes for dilution of samples

TECHNICAL NOTES

In conducting the assay, follow strictly the test protocol. Room temperature incubation means: Incubation at 20 - 25°C.

Reagents with different lot numbers should not be mixed. The microtiter plate and all reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately. Store the unused stripes of the microtiter plate together with the desiccant airtight at 2-8°C.

Use the **Dilution Buffer VP** for the dilution of **Conjugate Concentrate KK**.

The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is only 4 weeks stable. Please dilute only according to daily requirements. This applies to the 1:100 diluted **Conjugate Concentrate KK** too.

Before use, all kit components should be brought to room temperature. **Precipitates, possible in buffers, should be dissolved before use through mixing and warming.**

Incubation at room temperature means: Incubation at 20-25°C

Proper washing is of basic importance for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 μ l at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

When using an automatic microtiter plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

The **Substrate Solution S**, stabilised H_2O_2 -Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

When performing the assay, Controls **KS**, **PK**, **NK** and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g., 15 minutes).

To avoid distortions due to differences in incubation times the diluted Conjugate Concentrate **KK** as well as the succeeding

Substrate Solution S should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop**

Solution SL should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution **S**

STORAGE CONDITIONS

The microtiter plate wells and all undiluted reagents are stable until the expiry date if stored in the dark at 2-8°C.

Store the unused microtiter wells together with the desiccant at 2° to 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

The Substrate Solution (S), stabilised H_2O_2 -Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought to **room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect the absorbance** readings of the assay. However, Values for the patient samples will not be affected.

Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control Serum provided in this kit was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38 Irritating to eyes and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.

Following components contain **0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution** as preservative: **KK, VP**

R34 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

Following components contain **0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one** as preservative: **KK, VP, WP**

R36/38 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.

R20/21/R22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed

R36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Controls and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Positive Control, Negative Control, Control Serum and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, the diluted **conjugate concentrate KK** as well as the following **Substrate Solution S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) pipette in positions* A1/2 **100 µl Negative Control NK each**
- 2) pipette in positions* B1/2 **100 µl Positive Control PK each** (PK1,PK2 OR PK3, respectively)
- 3) pipette in positions*C1/2 **100 µl Control Serum KS each**
* of Microtiter plates PL1/PL2/P3
- 4) Pipette **100 µl each** of the **diluted sample** (generally 1:1000 diluted in Dilution Buffer **VP**) in the rest of the wells, according to requirements
- 5) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **2 hours at 37°C**
- 6) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 3 times with **300 µl Washing Buffer WP**. Empty the wells thoroughly.
- 7) Following the last washing step, pipette **100 µl** of the **1:100 diluted Conjugate Concentrate KK** in each well.
- 8) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plates for **2 hours at 37°C**.
- 9) After incubation wash the wells 3 times with **Washing Buffer WP** as described in step 6)
- 10) Pipette **100 µl of the TMB-Substrate solution S** in each well.
- 11) Incubate the plates for **30 Minutes in the dark at room temperature**.
- 12) After incubation pipette **100 µl Stop Solution SL** in each well.

Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm (Reference filter ≥590 nm)**

CALCULATION OF RESULTS

Calculations should be performed for each antigen (each plate) separately! Calculate the average of all multiple values.

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the Negative Controls NK should be below 0.25. The difference between the extinctions of Negative Controls NK and the respective Positive Controls PK must be at least 0.6.

Qualitative Calculation:

The negative control average is subtracted from the controls and samples to obtain absolute values (Blank).

Cut-off calculation:

The cut-off is 20% of the positive control average.

This value corresponds to a titre of 1:500 of a 1:1.000 diluted serum. 1:1.000 diluted sera with extinction values less than the cut off are regarded as negative.

Depending on the *Pseudomonas aeruginosa* species and the patient's immune reaction, antibodies can be detected against a single, two or even all three antigens simultaneously. A patient is regarded as sero-positive when the serum is positive for one or more of the antigens. In acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infected patients suffering from immunosuppression, assessment of an infection via the detection of antibodies may be inadequate.

Negative Control NK		Extinction
1.Value		0.041
2.Value		0.056
Mean		0.049

Positive Control PK		Extinction
1.Value		1.120
2.Value		1.136
Mean		1.128

Calculation

PK – NK	: 1.128 – 0.049	= 1.079
Cut-off (20% of PK-NK)	: 0.2 × 1.079	= 0.216
Borderline (50% of PK-NK)	: 0.5 × 1.079	= 0.540

All samples with an extinction < 0.216 are determined as negative for anti-*P. aeruginosa* IgG. Samples with an extinction of > 0.216 and < 0.540 are judged as borderline and samples showing an extinction of > 0.540 are determined as positive for anti-*P. aeruginosa* IgG.

Semi-quantitative calculation

The measured extinction values of the individual serum dilutions are plotted onto a graph or calculated using an appropriate computer programme.

The extinction values of the negative (NK) and positive (PK) controls are plotted on the y-axis of a linear plot. A so-called titre factor is in turn plotted on the x-axis, for NK = 0 and PK = 2.5. For the quantification of the sera values, a straight line is drawn through the NK and PK values and extended to a value of 3.5.

The titre of the individual serum is determined by reading the **titre factor** of the measured extinction value through the NK-PK axis, which is multiplied by the serum dilution factor.

Titre factors lower than 0.25 and higher than 3.5 (x-axis) are not taken into consideration in these calculations, except that the titre factors from a 1:1000 dilution below 0,5 are regarded as negative and titre factors greater than 3,5 are always positive and should be diluted further and retested for quantitative determination.

Categories:

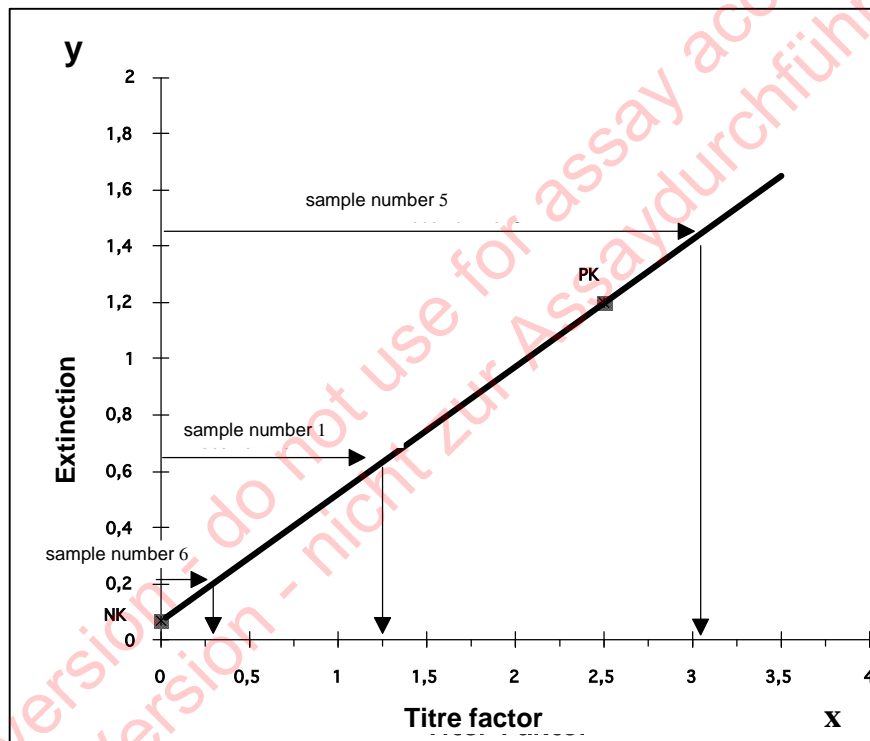
The semi-quantitative detection of human sera using the **mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA , E15**, is subdivided into the following categories:

Titre	Interpretation
< 1:500	negative
1:500 to 1:1 250	border-line
> 1:1 250	positive
> 1:10 000	chronically positive

Negative Control NK		Extinction
1.Value		0.041
2.Value		0.056
Mean		0.049

Positive Control PK		Extinction
1.Value		1.220
2.Value		1.176
Mean		1.198

Graphic



Calculation

Sample No.	Sample Dilution	Extinction (average)	Titre factor (see graphic)	Titre	Interpretation
Example:	Serum border-line				
1	Serum A 1:1 000	0.625	1.25	1:(1 000 x 1.25) => 1: 1 250	border-line
2	Serum A 1:10 000	0.075	< 0.25		cannot be calculated
3	Serum A 1:100 000	0.05	< 0.25		cannot be calculated
Example	Serum positive				
4	Serum B 1:1 000	2.82	> 3.5		positive
5	Serum B 1:10 000	1.45	3.05	1:(10 000 x 3.05) =>1:30 500	chronically positive
6	Serum B 1:100 000	0.210	0.3	1:(100 000 x 0.3) => 1:30 000	chronically positive
Example	Serum negative				
7	Serum C 1:1000	0.064	< 0.25	< 1:500	negative

LITREATURE / LITERATUR

1. West S, Zeng L, Lee L, Kosorok M, Laxova A, Rock M, Splaingard M, Farrell : Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis, early detection by serology and assesment of risk factors. JAMA, 2002, Vol 287, No.: 22: 2958-2967
2. Burns J, Gibson I, McNamara, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castille R, Smith A, Ramsey B: Longitudinal Assesment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. J Infect Dis 2001 ; 183 :444-52
3. Döring G, Obernesser H-J, Botzenhart K: Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. III Radioimmunoassay for detection of alkaline protease. Zentralbl Bakteriol Mikrob. Hyg (A) 1982; 252:239-47
4. Döring G., Obernesser H-J., Botzenhart K., Flehmig B., Høiby N., Hofmann A.: Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. J Infect Dis 1983; 147:744-50
5. Döring G.; Høiby N: Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. Infect Immun 1983; 42:197-201
6. Obernesser H-J, Döring G: Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. IV. Radioimmunoassay for detection of elastase. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A) 1982; 252:248-56
7. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M: Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Archives of Diseases in Childhood, 1986, 61, 1114-20
8. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M; Losowsky M S: Development of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* cell surface antigens in sera of patients with cystic fibrosis. J Clin Pathol 1986; 39: 1124-29
9. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M: Serum IgG antibodies in patient with cystic fibrosis with early *Pseudomonas aeruginosa* infection: Archives of Disease in Childhood, 1987, 62, 357-361
10. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M: Prediction and Diagnosis of Early *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis: a Follow-up Study: J of Clin Microb, Aug 1988 p 1565-70
11. Brett M M, Simmonds E J, Ghoneim A T M, Littlewood J M: The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early peudomonal infection in cystic fibrosis. Archives of Diseases in Childhood 1992; 67: 1086-1088
12. Danielsen L, Westh H, Balselv E, Rosdahl VT, Döring G: *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A antibodies in rapidly deteriorating chronic leg ulcers. The Lancet Jan 1996 Vol. 347 No.8996 p 265
13. Dasgupta MK; Lam J, Döring G, Harley FL, Zuberbuhler P, Lam K, Reichert A, Costerton JW, Dossetor JB: Prognostic implications of circulating immune complex and *Pseudomonas aeruginosa*-specific antibodies in cystic fibrosis. J Clin Lab. Immunol. 1987, 23, 25-30
14. Döring G, Dalhoff A, Vogerl O, Brunner H, Dröge U, Botzenhard K. In vivo activity of Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model. The J of Infectious Diseases, Apri 1994, 4/Vol 149 p 532-537
15. Döring G, Buhl V, Høiby N, Schiøth P O, Botzenhart K: Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in immune complexes isolated from sputum of cystic fibrosis patients. Acta path microb. immunol. scand Sect. C, 92: 307-312, 1984
16. Döring G, Goldstein W, Röll A, Schiøtz P O, Høiby N, Botzenhard K: Role of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzymes in Lung Infections of Patients with Cystic Fibrosis. Infection and Immunity, Sept 1985, p. 557-562

KURZANLEITUNG – Mediagnost P. aeruginosa EIA E15

Verdünnung von Reagenzien und Proben		
Konjugatkonzentrat KK	in Verdünnungspuffer VP	1:100
Waschpuffer WP	in Aqua dest. (z.B. 100 ml WP mit A.dest auf 2000 ml auffüllen)	1:20
Die Seren 1:1.000 mit Verdünnungspuffer verdünnen (qualitativer Test). Bei quantitativer Antikörperbestimmung empfiehlt sich eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungen 1:1.000 , 1:10.000 , 1:100.000 .		

Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipettieren	Reagenzien	Platte 1 AP	Platte 2 Ela	Platte 3 Exo
2 x 100 µl	Negative Kontrolle NK	A1/A2	A1/A2	A1/A2
2 x 100 µl	Positive Kontrolle PK1	B1/B2		
2 x 100 µl	Positive Kontrolle PK2		B1/B2	
2 x 100 µl	Positive Kontrolle PK3			B1/B2
2 x 100 µl	Kontrollserum KS	C1/C2	C1/C2	C1/C2
2 x 100 µl	Probenverdünnung	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren		
Alle 3 Platten werden mit Klebefolie verschlossen				

Inkubation: 2 h bei 37°C

3 x 300 µl	Absaugen und die Platten mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünnte Konjugatkonzentrat KK	In jede Vertiefung
Alle 3 Platten werden mit Klebefolie verschlossen		

Inkubation: 2 h bei 37°C

3 x 300 µl	Absaugen und die Platten mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Inkubation: 30 min im Dunkeln bei RT

100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)		

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

SUMMARY – MEDIAGNOST P. aeruginosa IgG EIA E15

Dilution of Reagents and Samples		
Conjugate concentrate KK	in Dilution Buffer VP	1:100
Washing buffer WP	in Aqua dest. (e.g. add 100 ml WP in to a graduated flask and fill with A.dest to 2000 ml)	1:20

Dilute samples **1:1000** with dilution buffer (qualitative test). For quantitative antibody assays it is recommended to perform dilutions of **1:1.000**, **1:10.000** and **1:100.000**.

Proposal of Assay Procedure for double determinations

Pipette	Reagents	Plate 1 AP	Plate 2 Ela	Plate 3 Exo
2 x 100 µl	Negative Control NK	A1/A2	A1/A2	A1/A2
2 x 100 µl	Positive Control PK1	B1/B2		
2 x 100 µl	Positive Control PK2		B1/B2	
2 x 100 µl	Positive Control PK3			B1/B2
2 x 100 µl	Control Serum KS	C1/C2	C1/C2	C1/C2
2 x 100 µl	Sample dilution	Pipette in the rest of the wells according to requirements.		

Seal the wells with the sealing tape

Incubation: 2 h at 37°C

3 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl each Wash Buffer WP/ well	in each well
100 µl	1:100 diluted Conjugate concentrate KK	in each well

Seal the wells with the sealing tape

Incubation: 2 h at 37°C

3 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl each Wash Buffer WP/ well	in each well
100 µl	Substrate Solution S	in each well

Incubation: 30 min in the dark at RT

100 µl	Stopping Solution SL	in each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

International Test description

CONJ	KK	1:100	DILU	BUF	VP	
WASHBUF	20x	WP				1:20 DILU A. dest.

SPE	1:1000	DILU	BUF	VP	↔	
°C	20-25 °C					

		MTP AP	MTP ELA	MTP Exo
100 µl	Control NEG NK	A1/2	A1/2	A1/2
100 µl	Control POS PK1	B1/2		
100 µl	Control POS PK2		B1/2	
100 µl	Control POS PK3			B1/2
100µl	CONTROL KS	C1/2	C1/2	C1/2
100 µl	SPE 1:1000 DILU BUF VP			
TAPE				

 2 h  37 °C

3x 300 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	CONJ KK 1:100 DILU VP
TAPE	

 2 h  37 °C

3x 300 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB s

 0.5 h  20-25 °C 

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	