

Anti-HAV IgM ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative und qualitative Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das

Hepatitis A-Virus

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative and Qualitative detection of IgM-Antibodies against

Hepatitis A-Virus

English

für Forschungsanwendungen / for research use only
Not for use in diagnostic procedures.
zum Gebrauch durch Fachpersonal! / for professional use!



REF **E11**



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/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	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/ Vá rugám sã respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
LOT	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	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/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
REF	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Bestellingsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Καταложен номер/ 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/ Armazener entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilittä 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/ Contenuto sufficiente 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/ Nevystavovateľ snečného svetla/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaista otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνεți 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/ incubatietijd/ 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
	Mix tubes with a Vortex mixer/ Mix Röhrchen mit Vortex Mixer/ Mélanger à l'aide d'un vortex/ Miscelare la provetta con agitatore Vortex/ Tubos de mezcla con mezclador de vortex/ Misturar os tubos com um agitador Vortex/ buisjes mengen met een Vortex/ Blanderør med Vortex-mixer/ Blanda rören med en vortexblandare/ Miksowanie rurek w mikserze Vortex/ Csővecskék keverése ötvénykeverővel/ Premiešať pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecați erubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla
MTP	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytką microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyeállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstitui
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbká/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Puffer/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Pufer/ Puskuri

DILU BUF X	Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ Verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ Späd i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluati în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Laimennetaan x puskuriin	
Control+	PK	Control Serum + / Kontrollserum + / Contôle sérique +/ Siero di controllo +/ Suero de control +/ Soro de Controllo +/ controleserum +/ Kontrolserum +/ Kontrollserum +/ Serum kontrolne +/ Ellenőrző szérum +/ Kontrolné sérum +/ Kontrolní sérum +/ Контролен серум +/ Kontrollseerum +/ Ορός ελέγχου +/ Ser de control +/ Kontrolni serum +/ Kontrolli seerumi +
Control-	NK	Control Serum - / Kontrollserum - / Contôle sérique -/ Siero di controllo -/ Suero de control -/ Soro de Controllo -/ controleserum -/ Kontrolserum -/ Kontrollserum -/ Serum kontrolne -/ Ellenőrző szérum -/ Kontrolné sérum -/ Kontrolní sérum -/ Контролен серум -/ Kontrollseerum -/ Ορός ελέγχου -/ Ser de control -/ Kontrolni serum -/ Kontrolli seerumi -
CONJ	KK	Conjugate Concentrate / Konjugatkoncentrat/ conjugué conc / Coniugato concentrato / Conjugado concentrado / Conjugado Concentrado / conjugaat geconcentreerd / konjugat koncentrat/ konjugat koncentrat/ konjugat koncentrat / Koniugat koncentrátum / Antitest és enzim páros/ konjugát/ конюгат Концентрат / konjugaat kontsentraat / Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Concentrat Compuși / Koncentrat konjugat / konjugaattitiiviste
WASHBUF 20x	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópufer koncentrátum/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralne pufru/ Pesuliuosiiviste	
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/ Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos	
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos	
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопираш 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 płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepiti podložku lepici páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleeriklepliindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiți ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä	
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm 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 ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ 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)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčný filter ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 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)	
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/ instructiuni 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/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin	

Inhaltsverzeichnis / Table of Contents

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

1.	ZWECKBESTIMMUNG	5
2.	GRUNDLAGEN	5
3.	TESTPRINZIP	5
4.	WARNHINWEISE UND VORSCHRIFTMAßNAHMEN	6
5.	PROBEN	7
6.	MATERIALIEN	8
7.	TECHNISCHE HINWEISE	9
8.	TESTVERFAHREN Qualitativ	10
9.	QUALITÄTSKONTROLLE	11
10.	AUSWERTUNG VON TESTERGEBNISSE / QUALITATIVE	11
11.	TESTVERFAHREN QUANTITATIV:	12
12.	AUSWERTUNG VON TESTERGEBNISSE / QUANTITATIVE	12
13.	EINSCHRÄNKUNGEN	Fehler!

Textmarke nicht definiert.

ENGLISH Instructions for use

14.	INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION, QUALITATIVE Assay	15
		23

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

Anti-HAV IgM ELISA E11	96 Bestimmungen
Regulatorischer Status	Für Forschungsanwendungen
Testprinzip	Sandwich ELISA
Dauer (Inkubationszeit)	3,5 h
Konjugatkonzentrat	100fach konzentriert
Antigenlösung	gebrauchsfertig
Verdünnungspuffer & Substrat	gebrauchsfertig
Waschpuffer	20fach konzentriert
Positiv- und Negativkontrolle	gebrauchsfertig
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:2000

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der MEDIAGNOST Anti-HAV-IgM ELISA ist ein Enzymimmunoassay **für Forschungszwecke** zum qualitativen und quantitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das Hepatitis A-Virus in Humanserum und -plasma

2. GRUNDLAGEN

Ein positiver Nachweis von Anti-HAV-IgM (Antikörper gegen das Hepatitis A-Virus der IgM-Klasse) im Serum oder Plasma von Patienten beweist eine frische Infektion mit dem Hepatitis A-Virus. Je nach Höhe des anti-HAV-IgM-Titers kann zwischen einer akuten Infektion (1-3 Monate nach Beginn der klinischen Symptomatik) und einer frühen Rekonvaleszenz (3-6 Monate) unterschieden werden. Bei ca. 10 % der klinisch Erkrankten bleibt das Serum noch länger anti-HAV-IgM positiv (6-12 Monate). Die Ermittlung und der Vergleich von Serumtitern zur Verlaufskontrolle sind im quantitativen Testverfahren möglich.

3. TESTPRINZIP

Der MEDIAGNOST Anti-HAV IgM ELISA ist ein Enzymimmunoassay, der auf dem "class-capture" Prinzip beruht.

Die verdünnten Proben werden in die Vertiefungen der Testplatte pipettiert, die mit einem Antikörper gegen humane IgM-Antikörper (μ -Ketten spezifisch) beschichtet sind. Alle in der Probe vorhandenen IgM-Antikörper werden gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Testplatte gewaschen. Danach wird das HAV-Antigen einpipettiert, das nur an die HAV-spezifischen IgM-Antikörper bindet. Nach der Inkubationszeit wird das überschüssige Antigen durch Waschen entfernt. Das gebundene Antigen wird durch Zugabe des Konjugats (monoklonaler Anti-HAV Antikörper, Peroxidase konjugiert) nachgewiesen. Anschließend wird das Substrat zugegeben. Bei Anwesenheit Anti-HAV spezifischer Antikörper in der Serumprobe wird das Substrat zu einem dunkelblauen Farbstoff umgesetzt, die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet und die Farbe schlägt um in Gelb. Die photometrisch ausgemessene Farbintensität, ist proportional zur Konzentration der HAV-spezifischen IgM Antikörper in der Probe.

4. WARNHINWEISE UND VORSCHRIFTMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zum In-vitro-Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost 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.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien. 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: **PK, NK, KK**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden. Das Antigen AG wurde mit Formaldehyd inaktiviert.

Reagenzien KK, VP, WP

enthalten als Konservierungsmittel **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** und **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (je <0,015%)

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/ regionalen/ nationalen/ internationalen Vorschriften.

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin. (<0.05%)

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stoppplösung (SL)

Die Stoppplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1. Erste-Hilfe Maßnahmen

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

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang 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.

5. PROBEN

5.1. Probenmaterial

Serum und EDTA-Plasma

5.2. Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3. Erforderliches Probenvolumen:

10 µL

5.4. Probenverdünnung

Die Verdünnung der Proben sollte in PE/PP-Gefäßen erfolgen. Bei größeren Serien empfiehlt sich der Gebrauch eines Multi-Steppers. Die Proben müssen vor jedem Verdünnungsschritt gut gemischt werden.

Empfohlene Verdünnung: für **qualitativen Testverfahren: 1:2000** mit Verdünnungspuffer **VP**.

Im **quantitativen Testverfahren** wird das Patientenserum mit Verdünnungspuffer in den Verdünnungsstufen 1:2000, 1:20000, 1:200000, 1:2000000.

Exemplarisches Verdünnungsprotokoll

1:20 Vorverdünnung

190 µL Verdünnungspuffer **VP** + **10 µL** Serum- oder EDTA-Plasma

Die vorverdünnte Probe sollte dann wie folgt verdünnt werden:

1:2000 Verdünnung

10 µL von der 1:20 vor-verdünnten Probe in **990 µL** Verdünnungspuffer **VP** geben

Weitere Probenverdünnung für den Quantitativen Testverfahren

1:20000 Verdünnung

100 µL von der 1:2000 verdünnten Probe in **900 µL** Verdünnungspuffer **VP** geben

1:200000 Verdünnung

100 µL von der 1:20000 verdünnten Probe in **900 µL** Verdünnungspuffer **VP** geben

1:2000000 Verdünnung

100 µL von der 1:200000 verdünnten Probe in **900 µL** Verdünnungspuffer **VP** geben

Nach dem Mischen **100 µL** von der jeweilig benötigten Verdünnung pro Vertiefung im Assay einsetzen.


Es wird empfohlen die verdünnten Proben innerhalb einer Stunde zu verbrauchen.

6. MATERIALIEN

6.1. Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind einzeln abbrechbar.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit anti-human-IgM (μ -chain spezifisch) beschichtet.	(8x12) Vertiefungen
KK	Konjugatkonzentrat , 100fach konzentriert: Peroxidase markiertes anti-HAV IgG (monoklonal, Maus).	1 x 250 μL
AG	HAV-Antigen , gebrauchsfertig, Hepatitis A Virus Antigen, inaktiviert.	13,5 mL
PK	Positivkontrolle , gebrauchsfertig, rekalfiziertes Humanplasma, reaktiv für anti-HAV-IgM, Titer > 1: 10000.	1 x 2 mL
NK	Negativkontrolle , gebrauchsfertig, rekalfiziertes Humanplasma, nicht reaktiv für anti-HAV IgM/IgG, HBsAg, anti-HIV, anti HCV.	1 x 1 mL
VP	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig, bitte vor Gebrauch schütteln.	1 x 120 mL
WP	Waschpuffer , 20fach konzentrierte Lösung.	1 x 50 mL
S	Substrat , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin (TMB).	1 x 12 mL
SL	Stopplösung , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	1 x

6.2. Zusätzlich benötigte Materialien

- Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP, 950 mL
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Vortex-Mischgerät
- Inkubator (geeignet für Inkubationen bei 37°C)
- Mikrotiterplattenwascher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und \geq 590 nm.
- Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

7. TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Testkit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist nur 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen vor Gebrauch gemixt und auf Raumtemperatur **20-25°C** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Verdünnung

Für die Verdünnung des Konjugatkonzentrates **KK** wird der Verdünnungspuffer **VP** verwendet. Es ist immer nur die jeweils benötigte Menge anzusetzen. Die Konjugatgebrauchslösung ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WP** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird. Es ist immer nur die jeweils benötigte Menge anzusetzen.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C. Die Substratlösung S, ist lichtempfindlich-Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten die Substratlösung S und die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Waschen

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.

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattegeometrie 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 Alternative. 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.

8. TESTVERFAHREN Qualitativ

Vorbereitung der Reagenzien			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
		Verdünnung	
KK	Konjugatkonzentrat	in Verdünnungspuffer VP (z.B. 10 µL KK + 990 µL VP)	1:100
WP	Waschpuffer	in Aqua dest. (z.B. 50 mL WP + 950 mL A.dest)	1:20
-	Proben	in Verdünnungspuffer VP (siehe Seite 7)	1:2000
Testdurchführung			
Pipettieren	Reagenzien		Position
-	Die erste Vertiefung (A1) Reagenzienleerwert wird freigelassen		- A1
100 µL	Positivkontrolle		PK B1/C1/D1
100 µL	Negativkontrolle		NK E1/F1
100 µL	Proben z.B. 1:2000 verdünnt, wir empfehlen Doppelbestimmung		Nach Bedarf
mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h bei 37°C			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	HAV-Antigen AG Lösung		Ab B1 in jede Vertiefung
mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h bei 37°C			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	Konjugat-Gebrauchslösung KK		Ab B1 in jede Vertiefung
mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h bei 37°C			
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung S		In jede Vertiefung, auch in A1!
Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20-25°C			
100 µL	Stopplösung SL		In jede Vertiefung, auch in A1!
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

Der Reagenzienleerwert wird von den Extinktionen der Kontrollseren und Proben subtrahiert. Dies ist bei den meisten Photometern durch einen Nullabgleich des Reagenzienleerwertes („Blank“) möglich.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

9.1. Qualitätskriterien

Die Differenz der Extinktionsmittelwerte der Positivkontrolle **PK** und der Negativkontrolle **NK** muss mindestens 0,4 betragen und die Extinktion der negativen Serumkontrolle darf 0,1 nicht übersteigen, andernfalls ist der Test nicht auswertbar.

10. AUSWERTUNG VON TESTERGEBNISSE / QUALITATIVE

30% des Extinktionswertes (Mittelwert) der Positivkontrolle **PK** + Extinktionswert (Mittelwert) der Negativkontrolle **NK** wird als Cut-off verwendet. Interpretation vom positiven Testergebnis: Proben mit einer Extinktion gleich oder höher als die Cut-off werden als positiv betrachtet. Probenwerte mit einer Extinktion von $\pm 10\%$ des Cut-off-Wertes werden als grenzwertig betrachtet. In diesem Fall wiederholen Sie den Test.

Die Berechnung des Cut-off (Grenzwertes) erfolgt anhand folgender Formel:
Extinktion der Positivkontrolle **PK** x 0,3 + Extinktion der Negativkontrolle **NK**.

Berechnungsbeispiel

Positivkontrolle PK :	Extinktion:
1	1,120
2	1,205
3	1,196
<u>Summe:</u>	<u>3.521</u>
Mittelwert:	$\frac{3,521}{3} = 1,174$
Negativkontrolle NK :	Extinktion:
1	0,021
2	0,025
<u>Summe:</u>	<u>0,046</u>
Mittelwert:	$\frac{0,046}{2} = 0,023$

Beispielhafte Rechnung des Cut-offs:

$$1,174 \times 0,3 + 0,023 = 0,375$$

Bei grenzwertigen Proben, d.h. Proben deren Extinktion im Bereich von $\pm 10\%$ des Cut-offs liegt, ist die Bestimmung zu wiederholen.

Im **obigen Beispiel** wären dies Proben mit einer Extinktion von $0,375 + 0,038 = 0,412$ bzw. $0,375 - 0,038 = 0,337$.

11. TESTVERFAHREN QUANTITATIV:

Im quantitativen Testverfahren können Seruntiter ermittelt und damit der Krankheitsverlauf kontrolliert werden.

11.1. Probenvorbereitung

(s. Probenverdünnung, Seite 7)

Im quantitativen Testverfahren wird das Patientenserum mit Verdünnungspuffer in den Verdünnungsstufen 1:2000, 1:20000, 1: 200000, 1:2000000) angesetzt.

11.2. Testdurchführung:

Von den oben genannten Serumverdünnungen werden je **100 µL** pro Vertiefung pipettiert (wir empfehlen Doppelbestimmungen). Testablauf sonst wie bei "Testverfahren Qualitativ" beschrieben.

12. AUSWERTUNG VON TESTERGEBNISSE / QUANTITATIVE

Beim quantitativen Nachweis des Anti-HAV-IgM erfolgt die Bestimmung des Titers mittels einer graphischen Darstellung oder über ein entsprechendes Auswerteprogramm.

Zur graphischen Darstellung wird halblogarithmisches Millimeter-Papier verwendet. Auf der Ordinate (y-Achse) werden die Extinktionen, auf der Abszisse (x-Achse, logarithmische Einteilung) werden die Verdünnungsstufen des Patientensersums aufgetragen.

Titerermittlung, Beispiel:

Mittelwert Extinktion Positivkontrolle **PK**: 1,240

Mittelwert Extinktion Negativkontrolle **NK**: 0,026

$$\text{Cut-off: } 1,240 \times 0,3 + 0,026 = 0,398$$

Serumverdünnungen	Extinktion:
1 : 2000	1,302
1 : 20000	1,098
1: 200000	0,630
1: 2000000	0,060

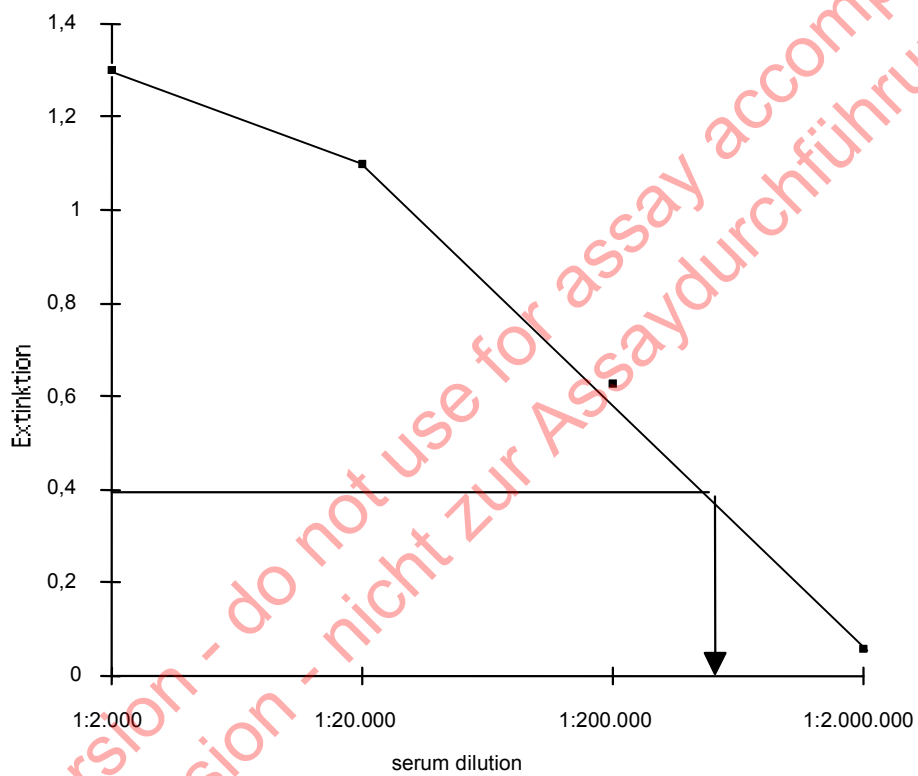
Die gemessenen Extinktionen der einzelnen Serumverdünnungen werden in das Diagramm eingetragen, ebenso der Cut-off als Gerade parallel zur Abszisse (siehe Graphik nächste Seite). Die Punkte der Messwerte werden zu einer Kurve verbunden; dort, wo die Titrationskurve die Cut-off Gerade schneidet, wird das Lot gefällt und der anti-HAV-IgM-Titer auf der Abszisse abgelesen.

Der Seruntiter in diesem Beispiel ist 1:500000.

13. EINSCHRÄNKUNGEN

Der Einfluss der heterophilen Antikörpern, Rheumafaktoren, Anti-Species Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Höhere Konzentrationen von verschiedenen physiologischen oder pharmazeutischen oder anderen Substanzen können die Messung stören.

Example for the graphical analysis



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

Table of Contents

1.	INTENDED USE	15
2.	INTRODUCTION	15
3.	ASSAY PRINCIPLE	15
4.	WARNINGS AND PRECAUTIONS	16
5.	SAMPLES	17
6.	MATERIALS	18
7.	TECHNICAL NOTES	19
8.	ASSAY PROCEDURE, Qualitative Test Procedure	20
9.	QUALITY CONTROL	21
10.	QUALITATIVE RESULTS	21
11.	QUANTITATIVE TEST PROTOCOL	21
12.	QUANTITATIVE RESULTS	21
13.	LIMITATION OF PROCEDURE	22
14.	INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION, QUALITATIVE Assay	23
15.	QUALITATIVE ASSAY PROCEDURE	24

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

ENGLISH Instructions for use

Anti-HAV ELISA E11	96 Determinations
Regulatory Status	For Research Use Only. Not for diagnostic purposes
Principle of the test	Sandwich ELISA
Duration (incubation period)	3.5 h
Conjugate Concentrate	100-fold concentrated
Antigen solution	Ready for use
Dilution Buffer and Substrate	Ready for Use
Washing buffer	20-fold concentrated
Positive and Negative Control	Ready for use
Sample	human Serum / Plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:2000

1. INTENDED USE

The mediagnost anti-HAV IgM ELISA E11, is an enzyme immunoassay for research use for the qualitative and quantitative detection of IgM antibodies in human serum or plasma directed against the Hepatitis A-Virus.

2. INTRODUCTION

The detection of anti-HAV IgM (IgM antibodies specific for Hepatitis A virus) in the serum or plasma of patients indicates a fresh infection with the Hepatitis-A virus. Depending on the anti-HAV IgM titre it is possible to differentiate between an acute infection (1 - 3 months after the start of clinical symptoms) and early convalescence (3 - 6 months). In rare cases (approx. 10% of all clinical cases) the anti-HAV IgM response remains positive (6 - 12 months).

3. ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost anti-HAV IgM ELISA is a "class-capture" enzyme immunoassay. Serum or plasma samples are diluted 1:2000 and added to the wells of a microtiter plate, which have been previously coated with an antibody directed against human IgM antibodies (μ -chain specific). All IgM antibodies present in the sample are bound during an incubation step. After washing, the Hepatitis A-virus is added, which binds only to the HAV-specific IgM antibodies. The bound antigen is detected by the addition of the conjugate (monoclonal anti-HAV antibody, peroxidase conjugated). After washing and incubation with a colorimetric substrate the reaction is terminated by addition of stop solution and the color turns 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.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro use and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum

Following components contain human material: **PK, NK, KK**

The antigen has been inactivated with formaldehyde. Source human serum for the control sera provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious. The antigen AG has been inactivated with formaldehyde.

Reagents KK, VP, WP

Contain as preservative 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (<0.015%)

H317 May cause an allergic skin reaction.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P261 Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.

P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.

P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P501 Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate Solution S

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

H335 May cause respiratory irritation.

P261 Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.

P305+P351+ IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.

P338 Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stopping Solution SL

The Stopping solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H₂SO₄)

H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

P301+P330+ IF SWALLOWED: rinse mouth.

P331 Do NOT induce vomiting.

P305+P351+ IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.

P338 Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P309+P310 IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

4.1. General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove 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: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5. SAMPLES

5.1. Sample type

Serum and EDTA-plasma

5.2. Specimen collections

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

5.3. Required sample volume:

10 μ L

5.4. Sample dilution

Qualitative Test: Dilution

Samples should be diluted in PE/PP-tubes. For larger sample numbers usage of a multi-stepper is recommended.

Recommended dilution for Qualitative Test: **1:2000** with Dilution Buffer **V**

Quantitative Test: Dilution

For quantitative results the samples are diluted 1:2000, 1:20000, 1:200000, 1:2000000 with Dilution Buffer **VP**.

Exemplary Dilution Protocol

1:20 Pre-Dilution

190 μ L Dilution Buffer **VP** + **10 μ L** Serum- or EDTA-Plasma

The pre-diluted sample should then be diluted as follows:

1:2000 Dilution

Add **10 μ L** of the 1:20 pre-diluted sample to **990 μ L** Dilution Buffer **VP**

1:20000 Dilution

Add **100 μ L** of the 1:2000 dilution to **900 μ L** Dilution Buffer **VP**

1:200000 Dilution

Add **100 μ L** of the 1:20000 dilution to **900 μ L** Dilution Buffer **VP**

1:2000000 Dilution

Add **100 μ L** of the 1:200000 dilution to **900 μ L** Dilution Buffer **VP**


After mixing use **100 μ L** each of the needed sample dilution per well

It is recommended to use the diluted sample within one hour.

6. MATERIALS

6.1. Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 tests. The microtiter plate is divided up in 12 strips with separately breakable wells.

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with an antibody directed against human IgM antibodies (anti- μ -chain). Wells are separately breakable.	(8x12) wells
KK	Conjugate Concentrate , 100fold concentrated (peroxidase conjugated anti-HAV IgG) (monoclonal, mouse).	1 x 250 μL
AG	Hepatitis A Virus antigen , inactivated, ready for use.	1 x 13.5 mL
PK	Positive Control , ready for use, recalcificated human plasma, reactive for anti-HAV-IgM, Titre > 1:10000.	1 x 2 mL
NK	Negative Control , ready for use, recalcificated human plasma, not reactive for anti-HAV-IgM/IgG. Anti-HBsAg, anti-HIV and anti HCV negative.	1 x 1 mL
VP	Dilution Buffer , ready for use. Please shake before use.	1x 120 mL
WP	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution.	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine (TMB).	1 x 12 mL
SL	Stopping Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate.	2 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Control Certificate	1 x

6.2. Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WP (A.dest.)**, 950 mL.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Incubator (suitable for incubations at **37°C**)
- Vortex-mixer
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm

7. TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components after initial opening is warranted for 4 weeks, store the unused strips and microtiter wells airtight together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The 1:20 diluted Washing Buffer WP is 4 weeks stable at 2-8°C.

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 – 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Dilution

Use the Dilution Buffer **VP** for the dilution of the Conjugate Concentrate **KK**. Prepare only the amount required. The diluted conjugate can be stored for at least one week at 4°C.

The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with **Aqua dest.** Please dilute only according to daily requirements.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution **S**, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Assay Procedure

When performing the assay reagents and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, diluted Conjugate Concentrate **KK**, as well as the Substrate Solution **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution **SL** should be added to the plate in the same order as Substrate Solution **S**. All determinations should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Washing

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 **WP** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL 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 dynamical 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.

8. ASSAY PROCEDURE, Qualitative Test Procedure

Reagent Preparation			
Before use bring all reagents to room temperature: 20-25 °C			
KK	Conjugate Concentrate	in Dilution Buffer VP (e.g. 10 µL KK + 990 µL VP)	1:100
WP	Washing Buffer	in Aqua dest. (e.g 50 mL WP + 950 mL A.dest)	1:20
-	Samples	In Dilution Buffer VP , see Page 17	1:2000
Assay Procedure			
Pipette	Reagents		Position
-	The first well (A1, blank) will be left empty		A1
100 µL	Positive Control		PK B1/C1/D1
100 µL	Negative Control		NK E1/F1
100 µL	Samples e.g. 1:2000 diluted, we recommend double determination.		according to demand
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µL Washing Buffer WP / well		in each well
100 µL	HAV-Antigen AG Solution		from B1 in each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µL Washing Buffer WP / well		in each well
100 µL	1:100 diluted Conjugate Concentrate		from B1 in each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µL Washing Buffer WP / well		in each well
100 µL	Substrate Solution S		in each well, also A1
Substrate S Incubation: 30 Minutes in the dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		in each well, also A1
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (reference filter ≥ 590 nm).			

The absorbance of the blank wells are subsequently subtracted from the control and sera to obtain the absolute values

9. QUALITY CONTROL

9.1. Quality Criteria

The average absorbance values of the Positive Controls **PK**, the Negative Controls **NK** and the samples are calculated.

The Negative Control **NK** extinction value should **not exceed 0.1**. The difference between extinctions of the Positive Control **PK** and Negative Control **NK** must be at least **0.4**, otherwise the test is considered invalid.

10. QUALITATIVE RESULTS

Cut-off calculation:

The sum of: 30% of the mean absorbance value of the Positive Control **PK** + mean absorbance value of the Negative Control **NK** is used as cut-off. Interpretation of positive: Samples with extinction equal or higher than the cut-off (30% of the average of the positive control + extinction average of the negative control) are regarded as positive. Samples with an extinction of $\pm 10\%$ of the cut-off value are regarded as border line samples. In this case repeat the test.

Calculation (example)

Positive Control PK

	<u>Extinction:</u>
1. value	1.120
2. value	1.205
3. value	1.196
<u>total:</u>	<u>3.521</u>
mean value:	$3.521 / 3 = 1,174$

Negative Control NK:

1. value	0.021
2. value	0.025
<u>total:</u>	<u>0.046</u>
mean value:	$0.046 / 2 = 0.023$

The exemplary cut-off: $1.174 \times 0.3 + 0.023 = 0.375$

Exemplary Sera with extinctions > 0.375 are regarded as positive.

Exemplary Border line samples: $0.375 \times 1.1 = 0.412$ (+ 10%); $0.375 \times 0.9 = 0.337$ (-10%)

Extinctions between 0.337 and 0.412

11. QUANTITATIVE TEST PROTOCOL

To determine the serum titer for example to control the course of disease the quantitative protocol is recommended.

11.1. Samples preparation

For quantitative results the patients serum is diluted 1:2000, 1:20000, 1: 200000, 1:2000000 with dilution buffer (See page 17).

11.2. Test Preparation

Pipette from the above-mentioned serum dilutions, 100 μ L per well (we recommend double determinations). The test protocol is identical to the "Qualitative" method.

12. QUANTITATIVE RESULTS

The evaluation is carried out graphically or via an appropriate evaluation program.

A graph is used to determine the titre in the quantitative calculation of anti-HAV IgM. The graph is plotted on semi-logarithmic paper. The extinction values are plotted on the Y-axis and the serum dilution values on the X-axis.

Cut-off calculation

The sum of: 30% of the mean absorbance value of the Positive Control **PK** + mean absorbance value of the Negative Control **NK** is used as cut-off. Interpretation of positive:

Titer calculation (example)

Positive Control **PK** average: 1.240
Negative Control **NK** average: 0.026
cut-off: $1.240 \times 0.3 + 0.026 = 0.398$

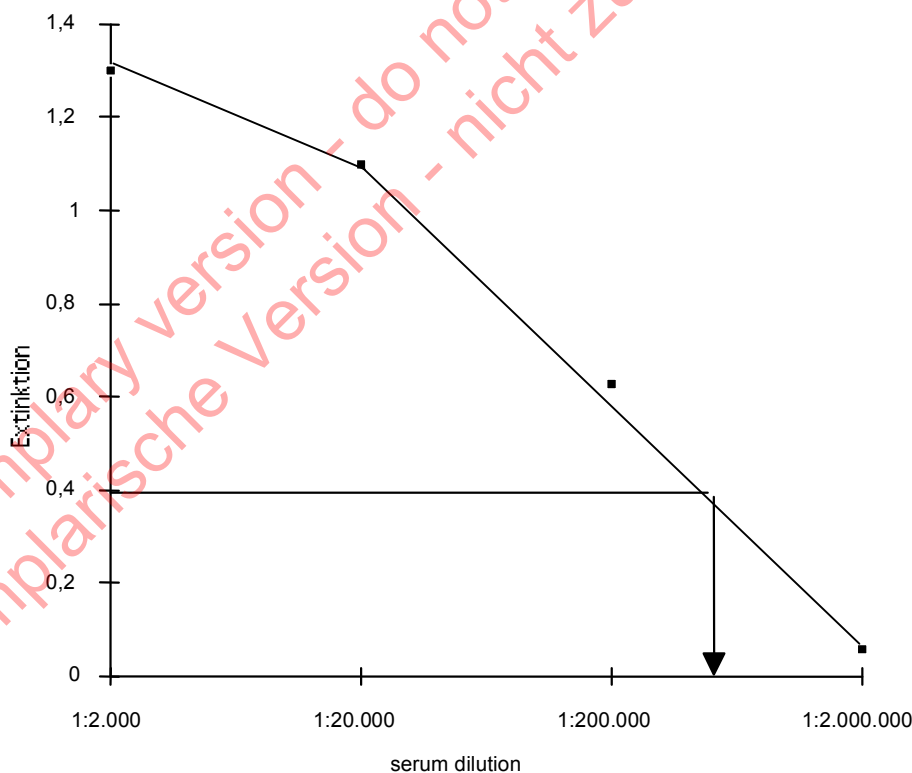
Sample dilution	Extinction
1:2000	1.302
1:20000	1.098
1:200000	0.630
1:2000000	0.060

The measured extinction values of the individual serum dilutions are plotted onto the graph including the cut-off value (drawn parallel to the Y-axis). The individual dots are joined by a line; where this line crosses the limiting value line it is possible to read, from the X-axis, the anti-HAV titre. The serum titre in this example is 1: 500000.

13. LIMITATION OF PROCEDURE

The influence of the heterophilic antibodies, rheuma factors, anti-species antibodies is reduced by the assay design, but cannot be completely excluded. Higher concentrations of physiological and pharmaceutical or other substances may interfere with the measurement.

Example for the graphical analysis



14. INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION, QUALITATIVE Assay

KK	CONJ	1:100 DILU BUF VP
WP	WASHBUF 20x	1:20 DILU A. dest.
SPE		1:2000 DILU BUF VP
°C 20-25 °C		

-	-	A1
100 µL	Control+ PK	B1/C1/D1
100 µL	Control- NK	E1/F1
100 µL	SPE	
TAPE		
🕒 1 h °C 37°C		
3x 300 µL	3x WASHBUF WP	3x 300 µL
100 µL	AG HAV-Antigen Solution	B1 → End
TAPE		
🕒 1 h °C 37°C		
3x 300 µL	3x WASHBUF WP	3x 300 µL
100 µL	CONJ KK	B1 → End
TAPE		
🕒 1 h °C 37°C		
3x 300 µL	3x WASHBUF WP	
100 µL	SUBST TMB S	
🕒 0.5 h °C 20-25°C 🌞		
100 µL	H ₂ SO ₄ SL	
MEASURE		

15. QUALITATIVE ASSAY PROCEDURE

Reagent Preparation			
Before use bring all reagents to room temperature: 20-25 °C			
KK	Conjugate Concentrate	in Dilution Buffer VP (e.g. 10 µL KK + 990 µL VP)	1:100
WP	Washing Buffer	in Aqua dest. (e.g. 50 mL WP + 950 mL A.dest)	1:20
-	Samples	In Dilution Buffer VP , see Page 17	1:2000
Assay Procedure in Double Determination			
Pipette	Reagents		Position
-	-		A1
100 µL	Positive Control		PK B1/C1/D1
100 µL	Negative Control		NK E1/F1
100 µL	Samples e.g. 1:2000 diluted		according to demand
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µL Washing Buffer WP / well		in each well
100 µL	HAV-Antigen AG Solution		from B1 in each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µL Washing Buffer WP / well		in each well
100 µL	1:100 diluted Conjugate Concentrate KK		from B1 in each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µL Washing Buffer WP / well		in each well
100 µL	Substrate Solution S		in each well, also A1
Substrate S Incubation: 30 Minutes in the dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		in each well, also A1
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (reference filter ≥ 590 nm).			