HAV-Antigen ELISA

Enzymimmunoassay zum Nachweis des

Hepatitis A-Virus Antigen

Nur zu Forschungszwecken!
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.

Exemplarische Version nicht für Assayduchführung verwenden

Σ 96

REF **E12**

mediagnost®
Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

: Aspenhaustr. 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

Inhaltsverzeichnis

VERWENDUNGSZWECK 4
GRUNDLAGEN 4
TESTPRINZIP 5
INHALT DER TESTPACKUNG 6
LAGERUNG DER MATERIALIEN 7
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN 7
SICHERHEITSHINWEISE 8
TECHNISCHE HINWEISE 11
TESTVORBEREITUNG 13
PROBENVORBEREITUNG 14
TESTDURCHFÜHRUNG 14
ERGEBNISSE 16
EINSCHRÄNKUNGEN UND TESTCHARAKTERISTIK 19
KURZANLEITUNG 20

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

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

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas exspirácie/ Doba exspirace/ 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 respectaţi instrucţiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/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 /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен 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/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
Σ	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/ Conţinut 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/ Nevystavovať slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Ţineţi departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta

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

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

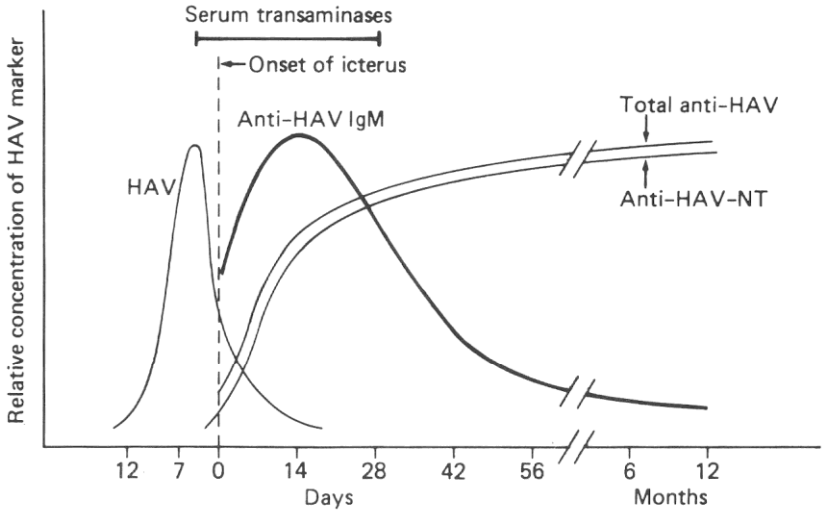
VERWENDUNGSZWECK

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

GRUNDLAGEN

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

für Assayanleitung verwenden



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

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

TESTPRINZIP

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

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

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

INHALT DER TESTPACKUNG

1) **Testplatte:**

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

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

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

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

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

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

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

5) **Verdünnungspuffer (Flasche D):**

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

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

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

7) **Stopplösung (Flasche F):**

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

8) **Waschpuffer (Flasche G):** 1 Fläschchen (**50 mL**) Waschpuffer, 20-fach konzentriert. Achtung: Endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4-Wochen haltbar, nur nach Bedarf ansetzen.

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

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

LAGERUNG DER MATERIALIEN

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

Testpackungen sind bei trockener Lagerung bei 2 - 8°C verwendbar bis zum angegebenen Datum (siehe Etikett). Bei sachgemäßer Handhabung beträgt die Haltbarkeit der Reagenzien nach dem ersten Öffnen vier Wochen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Inkubator

Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader") Filter bei 450 und ≥ 590 nm

Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

SICHERHEITSHINWEISE

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

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

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

Die Reagenzien **A, B, C, D** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) **2-Methyl-4-isothiazolin-3-one**
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.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

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

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

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
P305+P351	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
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 (E)

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

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.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

Stopplösung (F)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H_2SO_4)

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.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.
Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.
Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

TECHNISCHE HINWEISE

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

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

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

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

Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

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 gegebenenfalls durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusselndem Zellstoff verringert werden.

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

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

TESTVORBEREITUNG

1) Alle Reagenzien und die Testplatte müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden.

2) **Waschpuffer (G)**: Der 20-fach konzentrierte Waschpuffer wird 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Der gebrauchsfertig **verdünnte Waschpuffer G** ist nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

3) Zur Bestätigung positiver Reaktionen wird das **neutralisierende Serum (C)** 1:10 mit **Verdünnungs-puffer (D)** verdünnt eingesetzt. Dabei sollte nur die jeweils benötigte Menge angesetzt werden (50 µL pro Einzelmessung). Das verdünnte Serum ist mindestens eine Woche bei 4°C stabil.

4) Das **Konjugatkonzentrat (A)** wird 1:100 mit Verdünnungspuffer **(D)** verdünnt. Dabei sollte nur die jeweils benötigte Menge angesetzt werden (100 µL pro Einzelmessung). Die Konjugatgebrauchslösung ist mindestens eine Woche bei 4 °C haltbar.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

PROBENVORBEREITUNG

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

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

TESTDURCHFÜHRUNG

1) **Untersuchung von Stuhlsuspensionen und sonstigen Proben**: Bei jedem Testansatz sind neben den Proben eine **negative und eine positive Kontrolle** mitzuführen. Die positive Kontrolle **muss** zusätzlich unter neutralisierenden Bedingungen getestet werden. Zur Bestätigung positiver Ergebnisse wird dies auch für die Proben empfohlen. Allgemein sind Doppelbestimmungen wünschenswert, insbesondere bei den Kontrollen.

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

   Als negative Kontrolle werden je **50 µL Verdünnungspuffer (D)**, als positive Kontrolle je **50 µL** des **HAV-Antigens (B)** dazu pipettiert. Von den zu untersuchenden **Stuhlsuspensionen oder Proben** werden ebenfalls **je 50 µL** zupipettiert, sodass in jeder Vertiefung 100 µL Flüssigkeit vorliegen.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

2) Die Reaktionskammern werden mit Klebefolie verschlossen und **2 Stunden bei 37°C** inkubiert.

3) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben abgesaugt und die Vertiefungen **3 x** mit je **300 µL Waschpuffer (G)** pro Vertiefung gewaschen (Einwirkdauer des Waschpuffers ca.10 Sekunden je Waschschritt).

4) In jede Vertiefung werden **100 µL Konjugat-gebrauchslösung** (**A**) pipettiert, die Reaktionskammern mit Klebefolie verschlossen und **2 Stunden bei 37°C** inkubiert.

5) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Vertiefungen der Reaktionskammerstreifen **3 x** mit je **300 µL Waschpuffer (G)** pro Vertiefung gewaschen (Einwirkdauer des Waschpuffers ca. 10 Sekunden je Waschschritt).

6) In jede Vertiefung werden **100 µL der Substratlösung (E)** pipettiert und **30 Minuten im Dunkeln bei Raum-temperatur (20-25°C)** inkubiert.

7) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden in jede Vertiefung **100 µL Stopplösung (F**) dazu pipettiert.

8) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt bei **450 nm,** (**Referenzfilter ≥ 590 nm)**.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

ERGEBNISSE

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

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

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

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

Die positive Beurteilung trifft nicht zu, wenn die empfohlene HAV-Neutralisation durch Inkubation der Probe mit neutralisierendem Puffer C nicht mindestens eine Reduktion von 25 % verglichen mit dem Wert der nicht-neutralisierten Probe (Inkubation mit Verdünnungspuffer D) bewirkt.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

Proben, deren Messwerte über dem der positiven Kontrolle liegen und die durch Neutralisation um weniger als 25 % reduziert werden, müssen verdünnt erneut getestet werden. Die Verdünnung 1:10 in Verdünnungspuffer wird empfohlen.

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

Beispiel:

Extinktion positive Kontrolle 1: 1,114

Extinktion positive Kontrolle 2: 1,162

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

Extinktion negative Kontrolle 1: 0,024

Extinktion negative Kontrolle 2: 0,030

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

Abzug des Wertes der negativen Kontrolle von allen Messwerten (beispielhaft berechnet für die positive Kontrolle):

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

Berechnung des Grenzwertes und des Graubereichs:

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

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

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

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

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

EINSCHRÄNKUNGEN UND TESTCHARAKTERISTIK

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

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

Sensitivität:

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

Richtigkeit/Vorhersagewert:

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

Präzision:

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

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

Kreuzreaktionen sind nicht bekannt.

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

KURZANLEITUNG

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

Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µL	Verdünnungspuffer **D** oder neutralisierender Verdünnungspuffer (1:10 Verdünnung des neutralisierenden Serums **C**, s. oben) vorlegen; a) alle Proben einschließlich Positivkontrolle mit **beiden** Puffern testen **oder** b) nur Positivkontrolle mit **beiden** Puffern testen; In einem ersten Assay positiv getestete Proben in einem 2. Assay unter neutralisierenden Bedingungen testen (siehe Empfehlung)	In alle benötigten Vertiefungen
50 µL	Verdünnungspuffer **D** (Negativ-Kontrolle)	A1/A2
50 µL	Proben und Positivkontrolle (HAV-Antigen **B**)	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen abdecken.		
Inkubation: 2 h bei **37°C**		
3x 300 µL	Absaugen und die Platte mit **300 µL** Waschpuffer **G** / Vertiefung **dreimal** waschen.	in jede Vertiefung
100 µL	Konjugatgebrauchslösung **A**	in jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen abdecken.		
Inkubation: 2 h bei **37°C**		
3x 300 µL	Absaugen und die Platte mit **300 µL** Waschpuffer **G** / Vertiefung **dreimal** waschen.	in jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung **E**	in jede Vertiefung
Inkubation: 30 min im Dunkeln **bei RT**		
100 µL	Stopplösung **F**	in jede Vertiefung
Messung innerhalb von **30 min** bei **450 nm (Referenzfilter ≥590 nm).**		

Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden