

Anti-HAV ELISA

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

Hepatitis A-Virus

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Qualitative and Semi-Quantitative detection of 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!



2-8°C



96



REF **E10**



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/ Αεγumiskuupäev/ 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!
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/ Vyrobene/ Vyrobeno v/ Производител/ 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/ Каталоген 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/ Säilitäminen 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/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostatočný 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 de 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/ Țineți 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 Rührchen 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/ Miskowanie rurek w mikserze Vortex/ Csővecskék keverése örvénykeverővel/ 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 eprubetele 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/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikroitiiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ 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/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
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

Inhaltsverzeichnis / Table of Contents

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung	5
1. ZWECKBESTIMMUNG	5
2. EINFÜHRUNG	5
3. TESTPRINZIP	6
4. WARNHINWEISE UND VORSCHRIFTMAßNAHMEN	7
5. PROBEN	8
6. MATERIALIEN	9
7. TECHNISCHE HINWEISE	10
8. TESTVERFAHREN	11
9. QUALITÄTSKONTROLLE	12
10. AUSWERTUNG	12
11. EINSCHRÄNKUNGEN	15
12. ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	16
ENGLISH - Instructions for use	20
1. INTENDED USE	20
2. INTRODUCTION	20
3. ASSAY PRINCIPLE	21
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	22
5. SAMPLES	23
6. MATERIALS	24
7. TECHNICAL NOTES	25
8. ASSAY PROCEDURE	26
9. QUALITY CONTROL	27
10. EVALUATION OF RESULTS	27
11. LIMITATION OF PROCEDURE	31
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	31
13. LITERATUR / LITERATURE	34
14. International Test description for QUALITATIVE Assay	36

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung

Anti-HAV ELISA E10	96 Bestimmungen
Regulatorischer Status	Für Forschungsanwendungen
Testprinzip	Sandwich ELISA
Dauer (Inkubationszeit)	3,5 h
Konjugatkonzentrat	100fach konzentriert
Puffer & Substrat	gebrauchsfertig
Referenz-Material	WHO NIBSC 97/646 anti-hepatitis A immunoglobulin, WHO-Standard
Standards	3 Einzelstandards: 50 mIU/mL, 30 mIU/mL, 10 mIU/mL, gebrauchsfertig
Assay Range	0 – 50 IU/L
Positive und Negative Kontrolle	gebrauchsfertig
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	25 µL
Probenverdünnung	1:10
Analytische Sensitivität	1,10 mIU/mL
Durchschnittliche Interassay Varianz	< 30 %

1. ZWECKBESTIMMUNG

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

2. EINFÜHRUNG

Nach natürlichen Infektionen mit dem Hepatitis A-Virus erscheinen neutralisierende Antikörper parallel zur Bildung von Anti-HAV der IgG-Klasse (1). Der Anti-HAV Titer nach natürlichen Infektionen ist sehr hoch. Er liegt 3-6 Monate nach einer Infektion zwischen 100 und mehr als 300 internationalen Einheiten pro mL (International Units pro mL, IU/mL) und liegt auch Jahre nach einer Infektion noch bei 1 bis 10 IU/mL (2, 3).

Der minimale, schützende Titer liegt nach bisherigen Erkenntnissen bei 10 - 30 mIU/mL (milli-International Units pro mL) (2, 4). Da die Inzidenz einer HAV-Infektion in Nordeuropa bei Kindern in den letzten Jahren stark zurückgegangen ist, sind Kinder und Jugendliche überwiegend Anti-HAV negativ. In einer erwachsenen Population ist zu beobachten, dass der prozentuale Anteil der anti-HAV Positiven mit dem Alter ansteigt: nur 3,9 % junge Erwachsene (18-24 Jahren) wiesen Antikörper gegen Hepatitis A auf, im Gegensatz zur älteren Population mit 50 Jahren und älter, in der zu 40,3% Antikörper nachgewiesen werden konnte (12).

Eine hohe Inzidenz findet sich im Mittelmeerraum, in Afrika und Asien (5). Bei Klinikpersonal, insbesondere in pädiatrischen Kliniken, ist die Gefahr von HAV-Infektionen deutlich erhöht (6).

Seit Einführung eines Impfstoffes zur aktiven Immunisierung gegen HAV wird eine Impfung besonders vor Reisen in Länder mit hoher Hepatitis A-Inzidenz empfohlen.

3. TESTPRINZIP

MEDIAGNOST Anti-HAV ELISA ist ein pseudokompetitiver Enzymimmunoassay. Serumproben werden in den Vertiefungen einer mit Hepatitis A-Virus Antigen (HAV-Antigen) beschichteten Testplatte zwei Stunden bei 37 °C vorinkubiert. Antikörper gegen das Hepatitis A-Virus (Anti-HAV) in der Probe binden an das HAV Antigen. Durch Zugabe des Konjugats (Peroxidase konjugiertes Anti-HAV) werden unbesetzte Bindungsstellen abgesättigt (Inkubation 1 Stunde bei 37°C). Durch Waschen der Testplatte wird überschüssiges Konjugat entfernt. Das anschließend zupipettierte Substrat wird durch das gebundene Konjugat zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Reaktion wird nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe der Stopplösung beendet. Dabei schlägt die blaue Farbe nach gelb um. Die Intensität der Färbung wird photometrisch gemessen. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zum Anti-HAV Titer der Serumprobe.

Im **Semi-quantitativen Testverfahren** kann der Anti-HAV Titer anhand der Serumstandards aus der Testpackung bestimmt werden.

Die **Erstellung von Titrationskurven**, z.B. zur Kalibrierung von Seren anhand von Standardpräparaten ist ebenfalls durchführbar.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

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, STD**

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.

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 Plasma

Serum und Heparin / EDTA-Plasma ergeben vergleichbare Werte.

5.2. Probenentnahme

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

5.3. Erforderliches Probenvolumen:

25 µL

5.4. Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 4°C: max. 3 Tage
- Gefrier-/Auftau-Zyklen: max. 3

Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 3 Frier-/Taufzyklen zeigten keinen Einfluss auf Proben.

5.5. Interferenz

Antikoagulantien wie EDTA und Heparin in den gebräuchlichen Konzentrationen stören den Test nicht. Bilirubinkonzentrationen bis zu 200 µg/mL und Triglyceridkonzentrationen bis 5 mg/mL stören ebenfalls nicht. Stark hämolytische Proben (Hämoglobin >10 mg/mL) können falsch negative bzw. falsch niedrige Werte ergeben. Stark hämolytische Proben dürfen nicht verwendet werden.

5.6. Probenverdünnung

- Qualitativer Test: Verdünnung: **1:10** mit Verdünnungspuffer **VP**
- Semi-Quantitativer Test: Verdünnung **1:10** mit Verdünnungspuffer **VP**, **> 1:10** mit **VPN**

Für alle Verdünnungen **die größer als 1:10 sind**, eine 10 % -ige Lösung eines anti-HAV Antikörper negativen Serums **in Verdünnungspuffer VP** verwenden (**VPN**)

Beispiel Verdünnung 1:10:

25 µL Probe werden zu **225 µL** Verdünnungspuffer VP gegeben


Beispiel Verdünnung 1:50:

1 mL anti-HAV Antikörper negatives Serum wird mit **9 mL** Verdünnungspuffer **VP** gemischt (**VPN**).

10 µL Probe werden zu **490 µL** des Verdünnungspuffers mit negativem Serum (**VPN**) gegeben

6. MATERIALIEN

6.1. Inhalt der Testpackung

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit inaktiviertem Hepatitis A-Virus Antigen	(8x12) Vertiefungen
KK	Konjugatkonzentrat , 100fach konzentriert (Anti-HAV Ig, Peroxidase konjugiert)	1 x 100 µL
PK	Positive Kontrolle , 1 mL, anti-HAV positives Kontrollserum >500 mIU/mL, gebrauchsfertig.	1 x 1 mL
NK	Negative Kontrolle , 1 mL, anti-HAV negatives Kontrollserum, gebrauchsfertig.	1 x 1 mL
VP	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig. Bitte vor Gebrauch Schütteln!	1 x 120 mL
WP	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat.	1 x 12 mL
SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	1 x

Zusätzlich zum Semi-Quantitativen Test

STD1	Serum standard 1 (anti-HAV titer 50 mIU/mL) (STD1) ready for use.	1 x 1 mL
STD2	Serum standard 2 (anti-HAV titer 30 mIU/mL) (STD 2) ready for use	1 x 1 mL
STD3	Serum standard 3 (anti-HAV titer 10 mIU/mL) (STD 3) ready for use	1 x 1 mL

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)
- Anti-HAV-Antikörper negatives Serum (für Verdünnungen >1:10 zur semi-quantitativen Messung)
- Mikrotiterplattenwascher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 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 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 Alternative. 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 fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8. TESTVERFAHREN

Vorbereitung der Reagenzien			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
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 (z.B. 25 µL Probe + 225 µL VP)	1:10
VPN	VP +10% negatives Serum*	In Verdünnungspuffer VP (z.B. 1 mL negatives Serum + 9 mL	-
-	Proben	in Verdünnungspuffer + Serum VPN (z.B. 10 µL Probe + 490 µL VPN)	>1:10
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien		Position
100 µL	-		- A1/A2
100 µL	Positive Kontrolle		PK B1/B2
100 µL	Negative Kontrolle = Standard 4 0mIU/mL		NK C1/C2
100 µL	Standard 1 50 mIU/mL (nur bei semi-quantitativer Messung)		STD1 D1/D2
100 µL	Standard 2 30 mIU/mL (nur bei semi-quantitativer Messung)		STD2 E1/E2
100 µL	Standard 3 10 mIU/mL (nur bei semi-quantitativer Messung)		STD3 F1/F2
100 µL	Proben z.B. 1:10 verdünnt		nach Bedarf
mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 2 h bei 37°C			
50 µL	1:100 verdünntes Konjugatkonzentrat		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
Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20-25°C			
100 µL	Stopplösung SL		In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

* nicht im Test enthalten

Anstelle der im Test enthaltenen Standards, kann auch ein interner Standard eingesetzt werden. Dieser kann die Verdünnung eines Referenzpräparates sein, oder durch Titration eines Serums gegen ein Referenzpräparat hergestellt werden.

Referenzpräparate sind beim Paul-Ehrlich-Institut, (Postfach 17 40, 63207 Langen, Tel. 06103/770, Telefax: 06103/77123, anti-HAV Referenzpräparat, "PEI-Standard") oder beim: Central Laboratory of the Netherlands Red Cross (Plesmanlaan 125, 1006 CX Amsterdam, Telefax: 31 20 5123474, WHO International Reference Preparations, 97/646 anti-hepatitis A immunoglobulin, WHO-Standard) erhältlich.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen häufiger untersucht werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln.

9.1. Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes (A1/A2) **0,1** und die der positiven Kontrolle (PK) **0,15** OD₄₅₀ Einheiten nicht überschreiten. Das Signal der negativen Kontrolle (NK) muss größer als **1,0** OD₄₅₀ Einheiten Die Differenz zwischen der Extinktion der negativen Kontrolle (NK) und der positiven Kontrolle (PK) muss mindestens **0,4** OD₄₅₀ Einheiten betragen.

Im semi-quantitativen Verfahren sollten die Extinktionen der Proben innerhalb der Standardkurve liegen (NK – STD3). Liegen Proben außerhalb dieses Bereiches sollten sie zur sicheren Bestimmung in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

10. AUSWERTUNG

Unabhängig von der gewählten Auswertungsmethode wird zunächst von jedem Messwert bei 450 nm die Extinktion, die mit der gewählten Referenzwellenlänge (> 590nm) ermittelte Extinktion abgezogen. Im Anschluss daran wird von allen Werten die Extinktion des Blanks (A1/A2) ebenfalls abgezogen. Die so erhaltenen Messwerte stellen die Grundlage für alle weiteren Auswertungen dar.

10.1. Qualitative Auswertung

Zur qualitativen Bestimmung von anti-HAV-Antikörpern in humanem Serumproben wurde im Rahmen der Entwicklung ein Verfahren entwickelt, das eine Unterscheidung von positiven und negativen Probanden mit einer Sensitivität von 98,26% ermöglicht (n=801). Dazu wird, nach der folgenden Formel, ein Grenzwert (cut-off) aus dem Signal der Positiven Kontrolle und der Negativen Kontrolle berechnet:

$$cut - off = \frac{\text{Extinktion Negative Kontrolle} + \text{Extinktion Positive Kontrolle}}{2}$$

Proben, deren Extinktion größer ist als der cut-off Wert, sind als negativ zu bewerten. Proben, deren Extinktion kleiner ist, als der cut-off Wert, sind als positiv zu bewerten. Proben deren Extinktion im Bereich von +/- 10 % des cut-off Wertes liegen sind grenzwertig, die Bestimmung muss wiederholt werden.

Ein beispielhaftes Testergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Extinktionsdifferenz zwischen negativer und positiver Kontrolle ist größer als 0,4 (1,390 – 0,024). Die Berechnung des Grenzwertes (cut-off) ergibt folgendes Ergebnis.

$$cut - off = \frac{NK + PK}{2} = \frac{1,390 + 0,024}{2} = 0,707$$

Der Grenzwert beträgt also 0,707 damit sind alle Proben deren Signal höher ist als negativ (enthalten keine anti-HAV Antikörper) einzustufen und alle Proben bei denen das Signal niedriger ist als 0,707 als positiv (enthalten anti-HAV-Antikörper) zu beurteilen.

Die Extinktion der Serumprobe 1 ist größer als der cut-off Wert, sie ist also negativ. Die Extinktion der Serumprobe 2 ist kleiner als der cut-off Wert, sie ist positiv. Bei Serumprobe 3, deren Extinktion im Bereich von 0,778 - 0,636 (= 0,707 ± 10 %) liegt, ist die Bestimmung im obigen Beispiel zu wiederholen.

Tabelle 1: Ein Beispiel von einer Extinktionsmessung von einer Anti-HAV Bestimmung mit dem qualitativen Testverfahren Gezeigt sind die Extinktionen als Differenz aus dem Signal bei 450 nm und dem Signal bei 620 nm als Referenz.

Proben:	Extinktion	Mittelwert
Negative Kontrolle	1,372	1,390
Negative Kontrolle	1,408	
Positive Kontrolle	0,024	
Serumprobe 1	1,461	1,387
Serumprobe 1	1,312	
Serumprobe 2	0,025	0,023
Serumprobe 2	0,021	
Serumprobe 3	0,735	0,739
Serumprobe 3	0,743	

10.2. Semi-quantitative Auswertung

10.2.1. Berechnung eines Antikörpertiters

Neben der Berechnung eines Antikörpergehalts in mIU/mL durch den Einsatz eines definierten Standards, kann eine semi-quantitative Auswertung auch die Bestimmung eines Antikörpertiters erfolgen.

Dazu wird die unbekannte Probe in verschiedenen Verdünnungen in den Mediagnost E10 ELISA eingesetzt. In Abhängigkeit vom erwarteten Antikörpergehalt wird die Probe stärker oder weniger stark verdünnt. Die Verdünnung erfolgt hier in Verdünnungspuffer mit 10% eines negativen Serums.

Zur Ermittlung des Titers wird der Grenzwert (cut-off) wie folgt errechnet.

$$cut - off = \frac{\text{Extinktion Negative Kontrolle} + \text{Extinktion Positive Kontrolle}}{2}$$

Die Serumverdünnung, deren Extinktion unmittelbar unterhalb des cut-off liegt, stellt den Antikörpertiter dar.

10.2.2. Auswertung mit Mediagnost Standards

Eine genauere Bestimmung der Serumtiters kann im semi-quantitativen Testverfahren erfolgen. Dazu beinhaltet der Testkit 3 Standards, die eine definierte Menge an anti-HAV-Antikörpern enthalten. Diese sind gebrauchsfertig und können direkt als Probe im Test mitgeführt werden.

Diese Proben dienen zur Abschätzung des Anti-HAV Titers anhand einer Kalibrierungsgeraden. Die gemessenen Extinktionen der Serumstandards (STD1 – STD3) sowie der negativen Kontrolle (NK) als Standard mit der Konzentration 0 mIU/mL werden auf der y-Achse gegen die Konzentration (mIU/mL) des Anti-HAV Antikörpers auf der x-Achse aufgetragen und die Regressionsgerade durch die Punkte gelegt.

Zur rechnerischen Auswertung sind verschiedene Regressionsverfahren geeignet. Es sollte die Methode mit der besten Kurvenanpassung (mindestens $R^2 > 0.9$) gewählt werden. Idealerweise wird die Berechnung des Antikörpergehaltes der Proben mittels eines Auswertungsprogramms vorgenommen. Eine beispielhafte Standardkurve, die mit 4-Parameter-Logistik ermittelt wurde ist in Abbildung 1 gezeigt.

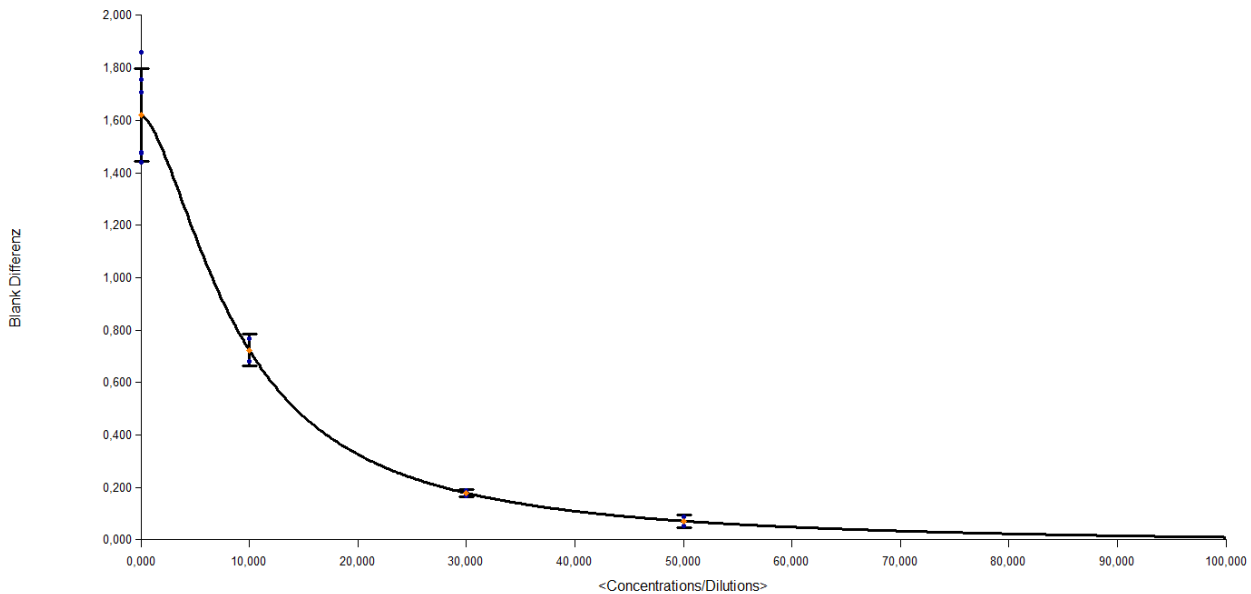


Abbildung 1: Exemplarische Standardkurve mit negativer Kontrolle als Standard mit der Konzentration von 0 mIU/mL.

In Tabelle 2 sind exemplarische Ergebnisse eines Mediagnost anti-HAV Antikörper ELISA dargestellt.

Tabelle 2: Ein Beispiel von einer Extinktionsmessung mit dem semi-quantitativen Verfahren bei Einsatz des Mediagnost Standards incl. negativ Kontrolle als Standard mit 0 mIU/mL. Die Probenverdünnung >1:10 erfolgte in Verdünnungspuffer mit 10% negativem Serum. Die Berechnung des Antikörpergehaltes der Probe erfolgte mit einem Auswertprogramm.

		Leerwert korrigierte OD ₄₅₀₋₆₂₀	Anti-HAV Titer in der verdünnten Probe (mIU/mL)	Anti-HAV Titer in der unverdünnten Probe (mIU/mL)
Positive Kontrolle:		0,01	-	-
Negative Kontrolle Standard 4		1,631	0	-
Standard 1		0,083	50	-
Standard 2		0,190	30	-
Standard 3		0,735	10	-
Probe	Verdünnung			
Serum 1	1:10	0,089	48,14	481
Serum 2	1:10	0,294	22,18	222
Serum 3	1:10	1,264	4,17	42
Serum 4	1:50	0,598	12,36	618
Serum 5	1:50	0,121	39,97	1998

10.3. Auswertung mit einer Referenzpräparation als Standard

Zusätzlich besteht die Möglichkeit zur Quantifizierung der anti-HAV-Antikörper Standards aus Referenzmaterial in den gewünschten Konzentrationen herzustellen. Die Verdünnung des Referenzmaterials sollte dazu in Verdünnungspuffer mit 10% anti-HAV Antikörper negativem Serum (VPN) erfolgen. Ein mögliches Ergebnis ist in Tabelle 3 dargestellt. Der Grenzwert für die Beurteilung der hier gezeigten Ergebnisse liegt bei 0,724 OD₄₅₀ Einheiten ((0,02+1,427)/2). Für die Berechnung des Antikörpergehaltes der Probe wird hier die Verdünnung der Probe gewählt deren Extinktion unmittelbar unterhalb des Grenzwertes liegt.

Bei Serum 1 liegt die Extinktion der 1:400 verdünnten Probe unmittelbar unterhalb des cut-off. Der Anti-HAV Titer in der verdünnten Probe beträgt 8,8 mIU/mL. Der Anti-HAV Titer des Serums beträgt also $8,8 \times 400 = 3\,520$ mIU/mL.

Bei Serum 2 liegt die Extinktion der 1:1600 verdünnten Probe unmittelbar unterhalb des cut-off. Der Anti-HAV Titer in der verdünnten Probe beträgt 8,5 mIU/mL. Der Anti-HAV Titer im unverdünnten Serum beträgt also $8,5 \times 1600 = 13\,600$ mIU/mL.

Tabelle 3: Ein Beispiel von einer Extinktionsmessung mit dem semi-quantitativen Verfahren bei Einsatz eines Referenzpräparates (NIBSC97/646). Das Referenzpräparat wurde in Verdünnungspuffer mit 10% negativem Serum auf die gezeigten Konzentrationen verdünnt ebenso wie die unbekanntenen Proben und im Assay eingesetzt. Die Berechnung des Antikörpergehaltes der Probe erfolgte mit einem Auswertprogramm.

	Extinktions- mittelwert	Anti-HAV Titer in der verdünnten Probe (mIU/mL)
Positive Kontrolle:	0,020	-
Negative Kontrolle	1,427	-
Standard 1*	0,068	50
Standard 2*	0,157	30
Standard 3*	0,334	15
Standard 4*	0,542	10
Standard 5*	0,838	5
Standard 6*	0,953	3
Standard 7*	1,245	1
Serum 1:		
1:100 verdünnt	0,110	
1:200 verdünnt	0,262	
1:400 verdünnt	0,571	$8,8 \times 400 = 3520$
1:800 verdünnt	0,761	
1:1600 verdünnt	1,048	
Serum 2:		
1:100 verdünnt	0,013	
1:200 verdünnt	0,036	
1:400 verdünnt	0,088	
1:800 verdünnt	0,228	
1:1600 verdünnt	0,532	$8,5 \times 1600 = 13600$

* nicht im Testkit enthalten

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Der Einfluss der heterophilen Antikörper, Rheumafaktoren und anti-Species Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Interferenz von verschiedenen physiologischen und pharmazeutischen Substanzen wurde für die angegebenen Konzentrationen getestet. Höhere Konzentrationen oder andere Substanzen können die Messung stören.

12. ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

12.1. Kalibration / Rückführbarkeit

Das Testsystem wurde anhand des internationalen Standards der WHO NIBSC 97/646 kalibriert. Die Rückführbarkeit der Testergebnisse ist exemplarisch in Abbildung X für den Standard in den Konzentrationen 10 und 30 mIU/mL im Zeitraum 1997 – 2014 gezeigt.

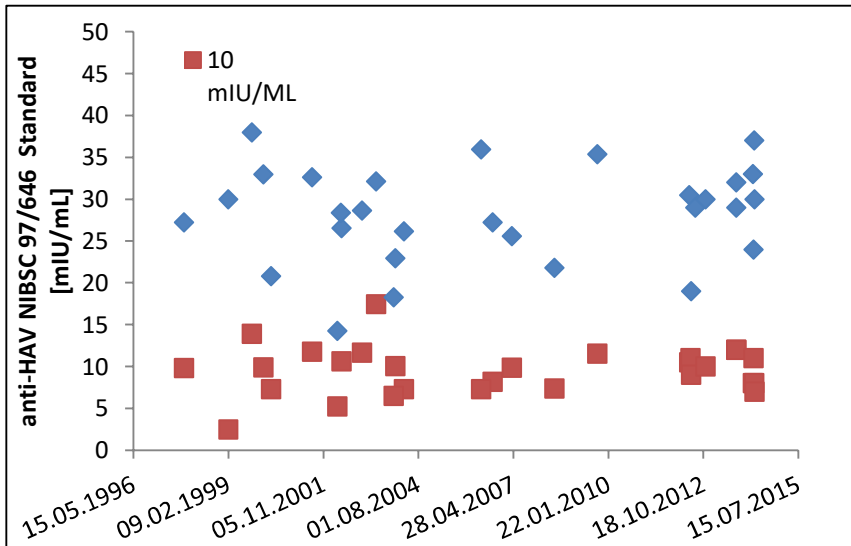


Abbildung 2: Rückführbarkeit des Mediagnost anti HAV Antibody ELISA E10

12.2. Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Mediagnost E10 ELISA wurde mit unterschiedlichen Verdünnungen des internationalen Standards NIBSC 97/646 untersucht. In Tabelle 4 sind die gemessenen Signale (OD₄₅₀) für verschiedene Konzentrationen dargestellt.

Tabelle 4: Analytische Sensitivität. (OD₄₅₀).

NIBSC [mIU/mL]	0	2	5	10	20
Wiederholungen-	1,577	1,327	1,136	0,925	0,564
	1,495	1,337	1,159	0,83	0,475
	1,587	1,297	1,108	0,898	0,557
	1,329	1,373	1,142	0,79	0,51
	1,562	1,071	1,111	0,819	0,505
	1,278	1,219	1,083	0,854	0,398
		1,225	1,093	0,812	0,464
		1,331	1,199	0,865	0,45
Mittelwert	1,47	1,27	1,13	0,85	0,49
Standardabweichung	0,13	0,10	0,04	0,05	0,06
Variationskoeffizient [%]	9	8	3	5	11

Die anhand der Signalschwankung der negativen Kontrolle (NK) berechnete analytische Sensitivität (n=6) beträgt 1,10 mIU/mL. Dieser theoretische Wert konnte durch die Messung einer des auf 1mIU/mL verdünnten Internationalen Standards bestätigt werden. Im Vergleich zur Negativen Kontrolle die ein Signal von 2,5 (SD 0,18) aufwies, zeigte die 1 mIU/mL Probe ein Signal von 2,12 (SD 0,2).

Desweiteren konnte durch die Messung von 801 humanen Serumproben (davon 287 positiv und 514 negativ bezüglich anti-HAV Antikörpern) gezeigt werden, dass der Mediagnost E10 ELISA sehr gut zwischen positiven und negativen Proben unterscheidet, die Sensitivität betrug 98,26 %.

12.3. Spezifität

Die Spezifität des Testsystems wurde durch den Einsatz von 25 Proben, die sicher negativ bezüglich anti-HAV Antikörpern waren jedoch positive für eine Reihe von Antikörpern gegen andere Viren (Tabelle 5)

Tabelle 5: Spezifität des Mediagnost anti-HAV Antikörper Tests

Nummer	Positiv getestet für	Antikörper	E10 Ergebnis
1	anti-HBc, anti-HBs	IgG	negative
2	anti-HBs, anti-HCV	IgG	negative
3	anti-HCV	IgG	negative
4	anti-HEV	IgG	negative
5	anti-HCV; anti-HEV	IgG	negative
6	anti-HCV	IgG	negative
7	anti-HCV	IgG	negative
8	anti-HBe; anti-HBc	IgG; IgG & IgM	negative
9	anti-HBs	IgG	negative
10	anti-HBs	IgG	negative
11	anti-HBs	IgG	negative
12	anti-HBs, anti-HBc	IgG; IgG & IgM	negative
13	anti-HCV	IgG	negative
14	anti-HEV	IgG	negative
15	anti-HBs	IgG	negative
16	anti-HBs	IgG	negative
17	anti-HBs	IgG	negative
18	anti-HBs	IgG	negative
19	anti-HBe; anti-HBc	IgG; IgG	negative
20	HBsAG; anti-HBs	IgG; IgG & IgM	negative
21	anti-HEV	IgG	negative
22	anti-HBs	IgG	negative
23	anti-HBs; anti-HBe; anti-HEV	IgG; IgG; IgG	negative
24	HBsAG, anti-HBe; anti-HBc;	IgG; IgG; IgG & IgM	negative
25	anti-HBc, anti-HBs	IgG; IgG	negative

12.4. Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des Testsystems wurde der Gehalt an anti-HAV Antikörpern in verschiedenen humanen Serumproben im Zeitverlauf in zwei verschiedenen Chargen innerhalb eines Jahres bestimmt.

Tabelle 6: Inter-Assay Variation. SD=Standardabweichung, CV%= Variationskoeffizient in %; Anzahl = Anzahl der unabhängigen Messungen

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
Mittelwert [mIU/mL]	19303	3077	297	378	46	1210	45	27	9	5
SD	2557	378	36	54	13	156	5	3	2	1
CV%	13	12	12	14	29	13	11	13	17	19
Anzahl	20	21	16	19	19	18	20	21	20	13

12.5. Linearität

Die Linearität des Testsystems wurde exemplarisch durch die Verdünnung von zwei humanen Seren mit hohem anti-HAV-Antikörpergehalt getestet. Die Verdünnung der Proben erfolgte bis 1:10 in Verdünnungspuffer und für alle Verdünnungen >1:10 in Verdünnungspuffer + 10 % anti-HAV-Antikörper negatives Serum (VPN). Dargestellt in Abbildung 3 sind die Verdünnungen 1:2,5 bis 1:80 für Serum 1 und 1:5 bis 1:320 für Serum 2. Insgesamt zeigt die Analyse mittels linearer Regression, dass das Testsystem eine hohe Linearität aufweist.

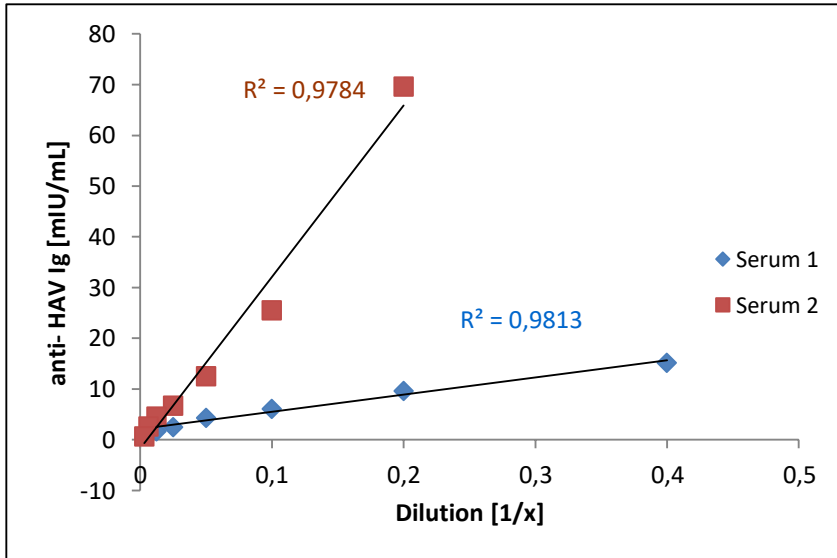


Abbildung 3 Linearität der Probenverdünnung.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

ENGLISH - Instructions for use

Table of Contents

ENGLISH - Instructions for use	20
1. INTENDED USE	20
2. INTRODUCTION	20
3. ASSAY PRINCIPLE	21
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	22
5. SAMPLES	23
6. MATERIALS	24
7. TECHNICAL NOTES	25
8. ASSAY PROCEDURE	26
9. QUALITY CONTROL	27
10. EVALUATION OF RESULTS	27
11. LIMITATION OF PROCEDURE	31
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	31
13. LITERATUR / LITERATURE	34
14. International Test description for QUALITATIVE Assay	36

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

ENGLISH - Instructions for use

Anti-HAV ELISA E10	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
Buffer and Substrate	Ready for Use
Reference material	WHO NIBSC 97/646 anti-hepatitis A immunoglobulin, WHO-Standard
Standard	3 Single Standards: ready for use, 50 mIU/mL, 30 mIU/mL, 10 mIU/mL
Assay Range	0 – 50 IU/L
Control	Ready for use
Sample	humanes Serum / Plasma
Required sample volume	25 µL
Sample dilution	1:10
Analytical sensitivity	1.10 mIU/mL
Inter-Assay Variance	< 30 %

1. INTENDED USE

Mediagnost anti-HAV ELISA, E10 is an enzyme immunoassay for the detection of antibodies against Hepatitis A virus in Human Serum **for research use**.

2. INTRODUCTION

After infection with the Hepatitis A-Virus, neutralising antibodies appear at the same time of Anti-HAV of IgG-Class formation (1). The Anti-HAV titers 3 to 6 months after naturally occurring infections are very high, within the range of 100 to more than 300 International Units per ml (IU/ml). Even after more than 10 years the titers usually remain at more than 1 to 10 IU/ml (2,3).

A value of 10 - 30 (mIU/ml) milli International Units can be considered the minimal protective level (2, 4). Since the incidence of HAV infection in children has diminished in Northern Europe in recent years, children and juveniles are predominantly Anti-HAV negative. In an adult population could be observed, that the percentage of anti-HAV positive individuals raises with increasing age: only 3.9 % of the young people (18-24 years) show antibody against HAV, where as in older population (≥50 years) HAV-Antibody was found in 40.3 % of the population (12).

In countries with less favourable sanitary conditions around the Mediterranean area, Africa or Asia, the incidence is very high. (5). Higher risk is also given for clinical staff, especially in the paediatric (6).

Since a vaccine against Hepatitis A virus infections is available, vaccinations are recommended for people travelling to countries where a high risk of HAV infections exists and for health care employees.

3. ASSAY PRINCIPLE

Mediagnost anti-HAV ELISA, E10 is a pseudo-competitive enzyme immunoassay. Serum or plasma samples are added to the wells of a microtiter plate, which have been previously coated with inactivated HAV antigen, and incubated for 2 hours at 37 °C. Anti-HAV antibodies bind to the antigen. The conjugate (peroxidase labeled anti-HAV) is added and incubated again for 1 h at 37 °C. Free binding sites of the antigen are bound with conjugate. Excess conjugate is washed of the plate and the substrate is added and incubated for 30 min at room temperature. The bound conjugate changes the colour of the substrate to blue. The reaction is terminated by adding the stopping solution. The colour turns yellow. The absorbance of the coloured reaction product is measured on a microtiter plate reader. The extinction is reciprocal to the anti-HAV titer.

For **semi-quantitative determination** use the included serum standards.

The **preparation of titration curve** e.g. for calibration of sera by means of standard reagents is also possible.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

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 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, STD 1-3**

The test plate MTP is coated with inactivated Antigen, which was negative in the rest infectivity test.

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 specimens should be treated as potentially infectious.

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 Plasma

Serum and Heparin / EDTA-Plasma yield comparable values.

5.2. Specimen collections

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

5.3. Required sample volume:

25 μ L

5.4. Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 4°C: max. 3 days
- Freeze-thaw cycles: max. 3

Freezing and thawing of samples should be minimized. 3 Freezing-thawing showed no effect on samples.

5.5. Interference

Anticoagulants like EDTA and heparin in the usual concentrations do not influence the test. Bilirubin concentrations do not interfere up to 200 μ g/mL and triglyceride concentrations up to 5 mg/mL. Strongly hemolyzed samples (hemoglobin > 10 mg/mL) can result in false negative or false low values. Strongly hemolyzed samples should not be used.

5.6. Sample dilution

- Qualitative Test: Dilution: **1:10** with Dilution Buffer **VP**
- Quantitative Test: Dilution **1:10** with Dilution Buffer **VP**, > **1:10** with **VPN**

Use a 10 % solution of **anti-HAV antibody negative serum** in **Dilution Buffer VP (VPN)** for all sample dilutions > **1:10**

Example: Dilution 1:10:

25 μ L Sample is added to **225 μ L Dilutionbuffer VP**.


Example: Dilution 1:50:

1 mL anti-HAV Antibody negative Serum is mixed with **9 mL Dilutionbuffer VP (VPN)**.

10 μ L Sample is added to **490 μ L** to this Dilution Buffer including negative Serum (**VPN**).

6. MATERIALS

6.1. Materials provided

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with inactivated HAV-antigen. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
KK	Conjugate Concentrate KK, 100fold concentrated (peroxidase labeled Anti-HAV Ig)	1 x 100 µL
PK	Positive Control, PK , anti-HAV positive control serum >500 mIU/mL, ready for use.	1 x 1 mL
NK	Negative Control, NK anti-HAV negative control serum, ready for use	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	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

Additional to Semi-Quantitative Test:

STD1	Serum standard 1 (anti-HAV titer 50 mIU/mL) (STD1) ready for use.	1 x 1 mL
STD2	Serum standard 2 (anti-HAV titer 30 mIU/mL) (STD 2) ready for use	1 x 1 mL
STD3	Serum standard 3 (anti-HAV titer 10 mIU/mL) (STD 3) ready for use	1 x 1 mL

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
- **Anti-HAV antibody negative serum** (for dilutions > 1:10 to the semi-quantitative measurement)
- 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

Reagent Preparation			
Before use bring all reagents to room temperature: 20-25 °C			
KK	Conjugate Concentrat	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 (e.g. 25 µL Sample + 225 µL VP)	1:10
VPN	VP +10% negative Serum*	In Dilution Buffer VP (z.B. 1 mL negative Serum + 9 mL VP)	-
-	Samples	in Dilution Buffer VP + Serum VPN (e.g. 10 µL Sample + 490 µL VPN)	>1:10
Assay Procedure in Doble Determination			
Pipette	Reagents		Position
100 µL	-		A1/A2
100 µL	Positive Control		B1/B2
100 µL	Negative Control = Standard 4 0 mIU/mL		C1/C2
100 µL	Standard 1 50 mIU/mL (only in semi-quantitative measurement)		D1/D2
100 µL	Standard 2 30 mIU/mL (only in semi-quantitative measurement)		E1/E2
100 µL	Standard 3 10 mIU/mL (only in semi-quantitative measurement)		F1/F2
100 µL	Samples e.g. 1:10 diluted		according to demand
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 2 h at 37°C			
50 µL	1:100 diluted Conjugate Concentrate		from B1 on in each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 37°C			
3x 300 µL	Aspirate the contents off he wells and wash 3x with 300 µL Wasching Buffer WP / well		in each well
100 µL	Substrate Solution S		in each well
Substrate S Incubation: 30 minutes in the dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		in each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (reference filter ≥ 590 nm).			

*not included in the test

Instead of the standards contained in the test, an internal standard can be used. This may be the dilution of a reference preparation, or prepared by titration of serum against a reference preparation.

Reference preparations are available from the Paul-Ehrlich-Institute, (Postfach 17 40, 63207 Langen, Tel. 06103/770, Telefax: 06103/77123, anti-HAV Reference sample, "PEI-Standard") or from the Central laboratory of the Netherlands Red Cross (Plesmanlaan 125, 1006 CX Amsterdam, Telefax 31 20 5123474, WHO International Reference Preparations, 97/646 anti-hepatitis A immunoglobulin, WHO-Standard).

9. QUALITY CONTROL

GLP requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be frequently assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

9.1. Quality criteria

In order to evaluate the results it should be ensured that the absorbances of the blank (**A1/A2**) **0.1** do not exceed the Positive Control **PK 0.15** OD₄₅₀ units. The signal of the Negative Control **NK** must be greater than **1.0** OD₄₅₀ units. The difference between the absorbance of the Negative Control **NK** and Positive Control **PK** must be at least **0.4** OD₄₅₀ units.

The absorbances of the samples should be within the standard curve (**NK - STD3**) in the semi-quantitative method. If the absorbances are outside this range, for reliable determinations, they should be determined again at higher dilutions in a second test.

10. EVALUATION OF RESULTS

First, the absorbance determined with the chosen reference wavelength (> 590 nm) is subtracted from each absorbance value at 450 nm, regardless of the chosen evaluation method. Following this, the absorbance of the blanks (A1/A2) is also subtracted from all values. The measured values thus obtained are the basis for all further analyzes.

10.1. Qualitative test analysis

For the qualitative determination of anti-HAV antibodies in human serum samples a method was created in the context of product development, which enables the distinctions of positive and negative probands with a sensitivity of 98.26 % (n = 801).

For this purpose a cut-off value is calculated from the signal of the positive control and negative control according to the following formula.

$$cut - off = \frac{\text{Extinction Negative Control} + \text{Extinction Positive Control}}{2}$$

Samples with mean absorbance values **higher than the cut-off value** are considered to be **negative**. Samples with **absorbance values less than** the cut-off are considered to be **positive**. Samples $\pm 10\%$ around the cut-off should be determined again.

An exemplary test result is shown in Table 1. The absorbance difference between negative and positive control is greater than 0.4 (1.390 to 0.024). The calculation of the cut-off value gives the following result.

$$cut - off = \frac{NK + PK}{2} = \frac{1.390 + 0.024}{2} = 0.707$$

The cut off value is therefore 0.707. Thus, all samples whose signal is higher than this are classified as negative (containing no anti-HAV antibody) and all samples in which the signal is lower than 0.707 are assessed as positive (containing anti-HAV antibody).

The absorbance of serum sample 1 is greater than the cut-off value, it is thus negative. The absorbance of serum sample 2 is less than the cut-off value, it is positive. In serum sample 3, the absorbance value is in the range of 0.778 to 0.636 (= 0.707 + 10 %), the determination must be repeated in the above example.

Table 1: Examples of absorbances of anti-HAV determinations using the qualitative test methods are shown as the difference between the absorbances at 450 nm signal and the signal at 620 nm as a reference.

Sample:	Extinction	Mean
Negative Control	1.372	1.390
Negative Control	1.408	
Positive Control	0.024	1.387
Serum Sample 1	1.461	
Serum Sample 1	1.312	
Serum Sample 2	0.025	0.023
Serum Sample 2	0.021	
Serum Sample 3	0.735	0.739
Serum Sample 3	0.743	

10.2. Semi-Quantitative test analysis

10.2.1. Antibodytitre calculation

In addition to the calculation of the antibody content in mIU/ml by using a defined standard, a semi-quantitative analysis can be carried out by the determination of the antibody titer. For this the unknown sample is used in various dilutions in the Mediagnost E10 ELISA. Depending on the expected level of antibodies, the sample is diluted more or less. For these dilutions the Dilution Buffer including 10 % negative serum (VPN) is used. To determine the titer of the (cut-off) value the following formula is used

$$cut - off = \frac{\text{Extinction Negative Control} + \text{Extinction Positive Control}}{2}$$

The serum dilution with an absorbance directly below the cut-off value represents the antibody titer.

10.2.2. Analysis with Mediagnost standards

A more accurate determination of serum titer can be carried out in semi- quantitative test method. For this purpose, the test kit includes 3 standards, which contain a defined amount of anti-HAV antibodies. These are ready to use and can be tested directly in the assay.

These samples are used to estimate the anti-HAV titer based on a calibration curve. The absorbance values of each serum standard (STD1 - STD3) and the negative control (NK) as standard with the concentration 0 mIU/mL are given on the y-axis against the concentration (mIU/mL) of the anti-HAV antibody on the x-axis and the regression line is placed through the points.

For computational evaluation various regression methods are useful. The method with the best curve fit (at least $R^2 > 0.9$) should be selected. Ideally, the calculation of the antibody content of the sample is performed by means of an evaluation program. An exemplary standard curve determined by 4-parameter logistics is shown in Figure 1.

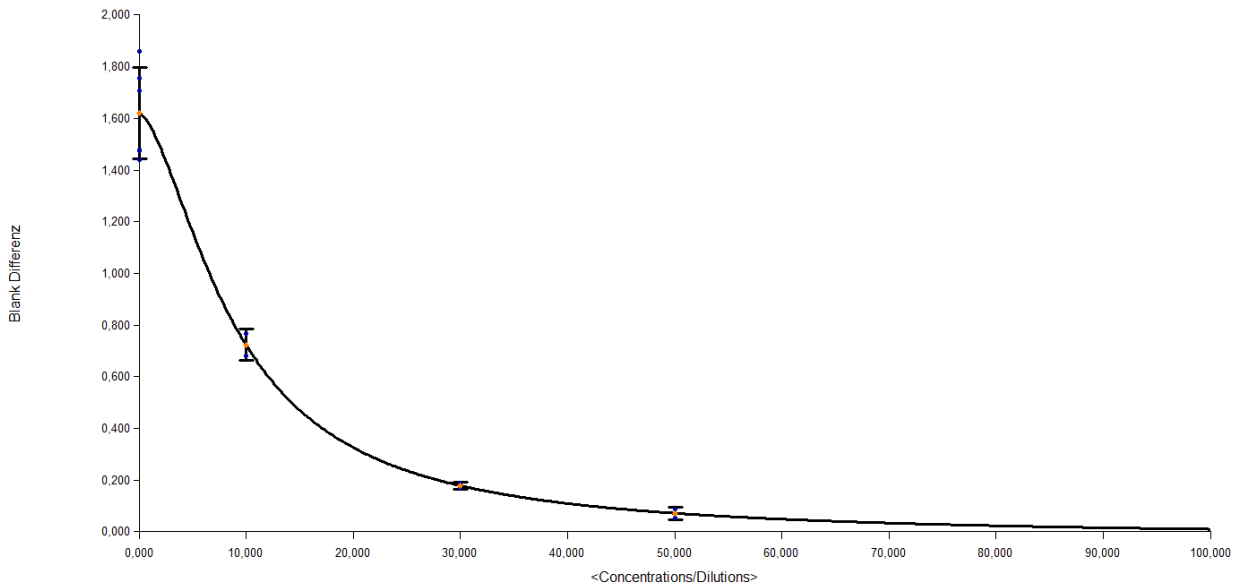


Figure 1: Exemplary standard curve with negative control as standard with the concentration of 0 mIU/mL.

In the table 2, exemplary results of anti-HAV Mediagnost antibody ELISA are shown.

Table 2: An example of an extinction with the semi-quantitative method when using the Mediagnost standards including negative control as standard with 0 mIU/mL. The sample dilution >1:10 was carried out in dilution buffer with 10% negative serum (VPN). The calculation of the antibody content of the sample was performed using an evaluation program.

		Blank corrected OD ₄₅₀₋₆₂₀	Anti-HAV Titer in the diluted Probe (mIU/mL)	Anti-HAV Titer in the undiluted sample (mIU/mL)
Positive Control		0.01	-	-
Negative Control		1.631	0	-
Standard 4		0.083	50	-
Standard 2		0.190	30	-
Standard 3		0.735	10	-
Sample	Dilution			
Serum 1	1:10	0.089	48.14	481
Serum 2	1:10	0.294	22.18	222
Serum 3	1:10	1.264	4.17	42
Serum 4	1:50	0.598	12.36	618
Serum 5	1:50	0.121	39.97	1998

10.2.3. Analysis with reference preparation

In addition it is also possible to prepare standards in the desired concentrations from reference material to quantify the anti-HAV antibody.

The reference material should be diluted with the Dilution Buffer with 10% anti-HAV antibody negative serum (VPN). An exemplary result is shown in Table 3.

The cut off value for the evaluation of the results shown here is 0.724 OD450 units $((0.02 + 1.427)/2)$. The dilution of the sample, which absorbance is directly below the cut off value, is chosen for the calculation of the antibody content.

In serum 1 the absorbance of the 1:400 diluted sample is immediately below the cut-off. The anti-HAV titre in the diluted sample is 8.8 mIU/mL. The anti-HAV titer of the serum is therefore $8.8 \times 400 = 3\,520$ mIU/mL.

In serum 2, the absorbance of 1:1600 diluted sample is immediately below the cut-off. The anti-HAV titre in the diluted sample is 8.5 mIU/mL. The anti-HAV titer in the undiluted serum is therefore $8.5 \times 1600 = 13\,600$ mIU/mL.

Table 3: Exemplary extinction measurement by the semi-quantitative method using the reference preparation (NIBSC 97/646): The reference preparation and the unknown samples were diluted in Dilution Buffer with 10 % negative serum (VPN) to the concentration as given in the table and used in the assay. The calculation of the antibody content of the sample was performed using an evaluation program.

	Extinction-Meanvalue	Anti-HAV Titer in the diluted samples (mIU/mL)
Positive Control:	0.020	-
Negative Control	1.427	-
Standard 1*	0.068	50
Standard 2*	0.157	30
Standard 3*	0.334	15
Standard 4*	0.542	10
Standard 5*	0.838	5
Standard 6*	0.953	3
Standard 7*	1.245	1
Serum 1:		
1:100 diluted	0.110	
1:200 diluted	0.262	
1:400 diluted	0.571	$8.8 \times 400 = 3520$
1:800 diluted	0.761	
1:1600 diluted	1.048	
Serum 2:		
1:100 diluted	0.013	
1:200 diluted	0.036	
1:400 diluted	0.088	
1:800 diluted	0.228	
1:1600 diluted	0.532	$8.5 \times 1600 = 13600$

*Not included in the test kit

11. LIMITATION OF PROCEDURE

The influence of the heterophilic antibodies, rheuma factors and anti-species antibodies is reduced by the assay design, but can not be completely excluded. The interference of various physiological and pharmaceutical substances was tested for the concentrations indicated. Higher concentrations or other substances may interfere with the measurement.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1. Assay Calibration

The assay is calibrated to the International Standard WHO 97/646 material. The traceability of the measured results is shown in Figure 2. Exemplary results for the International Standard NIBSC 97/646 are shown for 30 and 10 mIU/mL from 1997 to 2014.

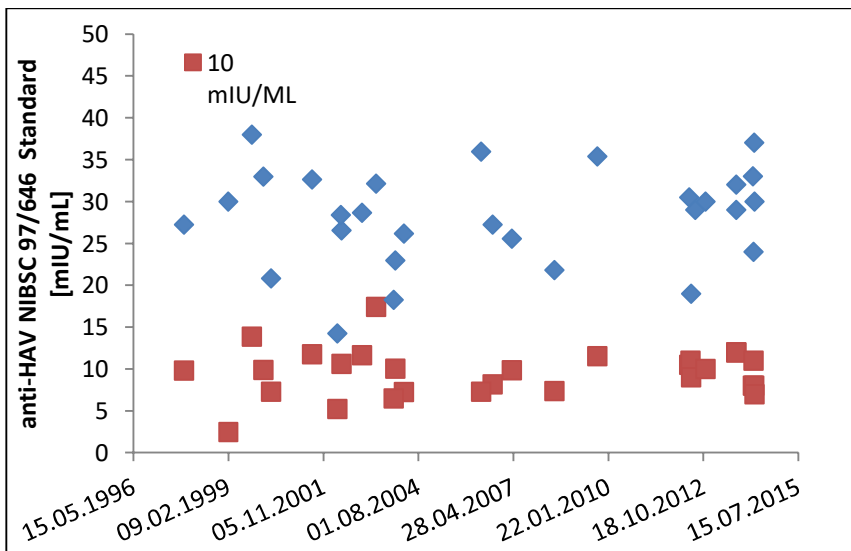


Figure 2: Traceability of Mediagnost anti HAV Antibody ELISA, E10

12.2. Sensitivity

The sensitivity of the test system was evaluated by the International standard NIBSC 97/646. The standard material was diluted and the dilution was applied as sample in the Mediagnost anti-HAV antibody ELISA, E10. The measured signals (OD_{450}) are shown in table 4.

Table 4: Analytical sensitivity. Shown are the measured signals (OD_{450}).

NIBSC [mIU/mL]	0	2	5	10	20
Replicates-	1.577	1.327	1.136	0.925	0.564
	1.495	1.337	1.159	0.83	0.475
	1.587	1.297	1.108	0.898	0.557
	1.329	1.373	1.142	0,79	0,51
	1.562	1.071	1.111	0,819	0,505
	1.278	1.219	1.083	0,854	0,398
		1.225	1.093	0,812	0,464
		1.331	1.199	0,865	0,45
Mean	1.47	1.27	1.13	0,85	0,49
SD	0.13	0.10	0.04	0,05	0,06
CV [%]	9	8	3	5	11

The recalculated analytical sensitivity resulting from the 2fold standard deviation of the negative control (n=6) is 1.10 mIU/mL. In an additional experiment the theoretically calculated analytical

sensitivity was proven by 1 mIU/mL diluted NIBSC 97/646. Here the negative control showed a signal of 2.5 (SD 0.18) and the diluted international standard had a signal of 2.12 (SD 0.2).

Furthermore, through the measurement of 801 human serum samples (of which 287 were positive and 514 negative for anti-HAV antibodies) can be shown that the Mediagnost E10 ELISA distinguishes very well between positive and negative samples, the sensitivity was 98.26 %.

12.3. Specificity

Assessment of the specificity of the E10 ELISA was done with 25 samples negative for anti-HAV-IgG antibody positive for IgG Antibodies against different viruses (Table 5).

Table 5: Specificity of the Mediagnost anti-HAV antibody test

Sample No	Tested Positive for	Antibody	E10 result
1	anti-HBc, anti-HBs	IgG	negative
2	anti-HBs, anti-HCV	IgG	negative
3	anti-HCV	IgG	negative
4	anti-HEV	IgG	negative
5	anti-HCV; anti-HEV	IgG	negative
6	anti-HCV	IgG	negative
7	anti-HCV	IgG	negative
8	anti-HBe; anti-HBc	IgG; IgG & IgM	negative
9	anti-HBs	IgG	negative
10	anti-HBs	IgG	negative
11	anti-HBs	IgG	negative
12	anti-HBs, anti-HBc	IgG; IgG & IgM	negative
13	anti-HCV	IgG	negative
14	anti-HEV	IgG	negative
15	anti-HBs	IgG	negative
16	anti-HBs	IgG	negative
17	anti-HBs	IgG	negative
18	anti-HBs	IgG	negative
19	anti-HBe; anti-HBc	IgG; IgG	negative
20	HBsAG; anti-HBs	IgG; IgG & IgM	negative
21	anti-HEV	IgG	negative
22	anti-HBs	IgG	negative
23	anti-HBs; anti-HBe; anti-HEV	IgG; IgG; IgG	negative
24	HBsAG, anti-HBe; anti-HBc;	IgG; IgG; IgG & IgM	negative
25	anti-HBc, anti-HBs	IgG; IgG	negative

12.4. Precision Data

Serum samples were measured in at least 13 independent assays and the variation of the measurement result was calculated (Table 6).

Table 6: Inter-Assay Variation. SD= Standard deviation, CV% = Coefficient of Variation in %, Number = Number of the independent determinations.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
Mean [mIU/mL]	19303	3077	297	378	46	1210	45	27	9	5
SD	2557	378	36	54	13	156	5	3	2	1
CV%	13	12	12	14	29	13	11	13	17	19
Number	20	21	16	19	19	18	20	21	20	13

12.5. Linearity

The linearity of the assay was exemplary by the dilution of two human sera with high anti-HAV antibody titer. The dilution of the samples was carried out until 1:10 in Dilution Buffer (VP) and for all dilutions > 1:10 in Dilution Buffer + 10 % anti -HAV antibody negative serum (VPN). In Figure 3 the dilutions of 1: 2.5 to 1:80 for serum 1 and 1:5 to 1:320 for serum 2 are shown. By means of linear regression can be shown, that the linearity of the test system is very high.

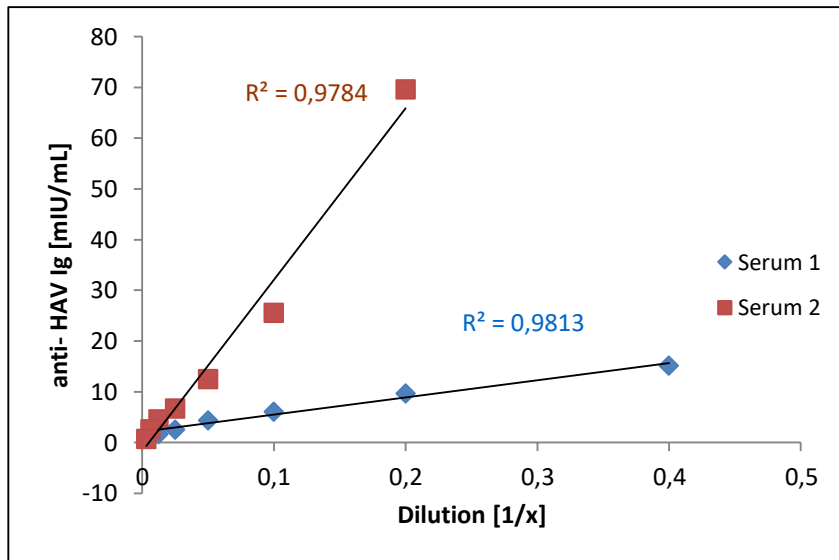


Figure 3 Linearity of the sample dilution.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

13. LITERATUR / LITERATURE





- 1) Flehmig, B.: Hepatitis A. Baillière`s Clinical Gastroenterology, Vol.4 No. 3, p. 707, 1990.
- 2) Ambrosch, F. et al.: Comparison of HAV-Antibodies Induced by Vaccination, Passive Immunization, and Natural Infection. Viral Hepatitis and Liver Disease. S. 98 (1990). (Editors: Hollinger, Lemon, Margolis, erschienen bei Williams and Wilkins, Baltimore; ISBN 0-683-04120-7).
- 3) Delem, A. et al.: Characterization of the immune response of volunteers vaccinated with a killed vaccine against hepatitis A. Vaccine, Vol. 11, Issue 4, S. 479 (1993).
- 4) Heinricy, U. et al.: Schedule-dependent Immune Response to Hepatitis A Vaccination. Viral Hepatitis and Liver Disease. S. 108 (1990). (Editors: Hollinger, Lemon, Margolis, erschienen bei Williams and Wilkins, Baltimore; ISBN 0-683-04120-7).
- 5) Jilg, W.: Hepatitis-A-Impfung - Anmerkungen zur Diagnostik. Klin. Lab. 38, S.697 (1992).
- 6) Van Damme, P.; Cramm, M.: Hepatitis A vaccination for health care workers. British Medical Journal, Vol. 306, S1615, 1993).
- 7) Turner, P. C. et al: Screening Before Hepatitis-A Vaccination. Lancet 340/8828, S.1160 (1992).
- 8) Germanaud, J.; Causse, X.: Stratégie de la vaccination contre l`hepatite A. La Presse Médicale, 22, n° 21, S 1104, (1993).
- 9) Brede, H. D.: Hepatitis-A-Gefahr für Hong-Kong Touristen, BIOforum 6, S.222 (1993).
- 10) Euteneuer, B.: Hepatitis A und Immunprophylaxe. LABOR AKTUELL 5.93, Herausg. Bioscientia Ingelheim.
- 11) Karpinski, K. F. et al.: Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulin levels using the enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Immunological Methods, 103, S.189 (1987).
- 12) Bölke, E.; Flehmig B.: New epidemiological patterns of Hepatitis A and B in Germany. Zbl.Hyg. 196, 511-514 (1995)

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assay-Durchführung verwenden

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

14. International Test description for QUALITATIVE Assay

KK	CONJ	1:100 DILU BUF VP
WP	WASHBUF 20x	1:20 DILU A. dest.
SPE		1:10 DILU BUF VP
°C 20-25 °C		

-	-	A1/A2
100 µL	Control+ PK	B1/B2
100 µL	Control- NK	C1/C2
100 µL	SPE	
TAPE		
 2 h °C 37°C		
50 µL	CONJ KK	B1/B2 → 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	H₂SO₄ SL	
MEASURE		