Anti-Pseudomonas aeruginosa IgG ELISA

Enzymimmunoassay für die qualitative und quantitative Bestimmung von

humanen Antikörpern gegen Pseudomonas aeruginosa

Deutsch

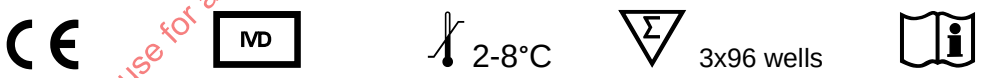
Enzyme Immunoassay for Qualitative and Quantitative Determination of

Human Antibodies against Pseudomonas aeruginosa

English

Europäische Union / European Union,
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



REF **E15**

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

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

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SI/ 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 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!
	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ In vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnumme/ 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 doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ 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
	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 sluwnečnímu 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
	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
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepať/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Miktrotiter plate / Mikrotiterplatte / plaque de microtitrage / Piastra di microtitolazione / Placa de microtitulación / Placa de Microtitulação / Microtiterplaat / Mikrotiterplade / mikrotiterplatta / microtiterplaat / Płytka microtiter / Mikrotiter lap / Mikrotitračná podložka / Mikrotitrační podložka / Микротитърна плака / Mikrotiiterplaat / Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης / Microplacă / Mikrotitrska plošča / Mikrotiitterilevy
	Miktrotiter plate 1 / Mikrotiterplatte 1/ plaque de microtitrage 1/ Piastra di microtitolazione 1/ Placa de microtitulación 1/ Placa de Microtitulação 1/ Microtiterplaat 1/ Mikrotiterplade 1/ mikrotiterplatta 1/ microtiterplaat 1/ Płytka microtiter 1/ Mikrotiter lap 1/ Mikrotitračná podložka 1/ Mikrotitrační podložka 1/ Микротитърна плака 1/ Mikrotiiterplaat 1/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης 1/ Microplacă 1/ Mikrotitrska plošča 1/ Mikrotiitterilevy 1

Exemplary Version-do not use for easy accomplishment / Exemplarische Version - nur für Testzwecke

ELA	Miktrotiter plate 2 / Mikrotiterplatte 2/ plaque de microtitrage 2/ Piastra di microtitolazione 2/ Placa de microtitulación 2/ Placa de Microtitulação 2/ Microtiterplaat 2/ Mikrotiterplade 2/ mikrotiterplatta 2/ microtiterplaat 2/ Płytka microtiter 2/ Mikrotiter lap 2/ Mikrotitračná podložka 2/ Mikrotitrační podložka 2/ Микротитърна плака 2/ Mikrotiiterplaat 2/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης 2/ Microplacă 2/ Mikrotitrska plošča 2/ Mikrotiitterilevy 2
Exo A	Miktrotiter plate 3 / Mikrotiterplatte 3/ plaque de microtitrage 3/ Piastra di microtitolazione 3/ Placa de microtitulación 3/ Placa de Microtitulação 3/ Microtiterplaat 3/ Mikrotiterplade 3/ mikrotiterplatta 3/ microtiterplaat 3/ Płytka microtiter 3/ Mikrotiter lap 3/ Mikrotitračná podložka 3/ Mikrotitrační podložka 3/ Микротитърна плака 3/ Mikrotiiterplaat 3/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης 3/ Microplacă 3/ Mikrotitrska plošča 3/ Mikrotiitterilevy 3
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
DET	Antibody-Enzyme Conjugate 100x/ Antikörper-Enzym Konjugat 100x / Conjugues anticorps-enzyme 100x / Coniugato di anticorpo-enzima 100x / Conjugado de anticuerpos-enzimas100x / Conjugado Anticorpo-Enzima 100x / Antilichaam-enzymconjugaat 100x / Antistoffer-enzym-konjugat 100x / Antikropps-enzymkonjugat (antikropp-enzym, konjugat) 100x / Koniugat antyciał-enzymów 100x / Antitest-enzim páros 100x / Protilátkový-enzymatický konjugát 100x / Protilátkový-enzymatický konjugát 100x / Антитяло-ензим конюгат 100x / Antikehad-ensüümi konjugaat 100x/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου 100x/ Compuşi din anticorpi-enzime 100x/ Antitelesa in konjugat encima 100x/ Vasta-aine-entsymi konjugaatti 100x
DIL	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdunningsbuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert / Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufor/ Ředicí pufr / Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης / Tampon de diluare/ Pufer za redčenje/ Laimennuspuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riediť / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluaţi / Razredčiti / Laimennetaan
CTR	Control / Kontrolle / Contôle / controllo / control / Controle / controle / Kontrol / Kontroll / kontrolne / Ellenőrző / Kontrolné / Kontrolní / Контролен / Kontroll / ελέγχου / control / Kontrolni / Kontrolli
PC1, PC2, PC3	Control + / Kontrolle +/ Contôle +/ controllo +/ control +/ Controle +/ controle +/ Kontrol +/ Kontroll +/ kontrolne +/ Ellenőrző +/ Kontrolné +/ Kontrolní +/ Контролен +/ Kontroll +/ ελέγχου +/ control +/ Kontrolni +/ Kontrolli +
NC	Control - / Kontrolle -/ Contôle -/ controllo -/ control -/ Controle -/ controle -/ Kontrol -/ Kontroll -/ kontrolne -/ Ellenőrző -/ Kontrolné -/ Kontrolní -/ Контролен -/ Kontroll -/ ελέγχου -/ control -/ Kontrolni -/ Kontrolli -
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufra/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuosiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопиращ разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluţie de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with cover foil/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkleeplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Acoperiţi placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure lábsorbance en léspace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur dónde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referinţă ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucţiuni internaţionale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje

Exemplary Version-do not use for assay a.c. Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

Deutsch - Gebrauchsanweisung 5
1 ZWECKBESTIMMUNG 5
2 EINFÜHRUNG 5
3 TESTPRINZIP 6
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 7
5 PROBEN 8
6 MATERIALIEN 9
7 TECHNISCHE HINWEISE 10
8 TESTDURCHFÜHRUNG 11
9 QUALITÄTSKONTROLLE 11
10 AUSWERTUNG 12
11 EINSCHRÄNKUNGEN 14
12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG 14

ENGLISH - Instructions for use 18
1 INTENDED USE 18
2 INTRODUCTION 18
3 PRINCIPLE 19
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 20
5 SAMPLES 21
6 MATERIALS 22
7 TECHNICAL NOTES 23
8 ASSAY PROCEDURE 24
9 QUALITY CONTROL 24
10 EVALUATION OF RESULTS 25
11 LIMITATION OF PROCEDURE 27
12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 27
13 LITERATUR / LITERATURE 30
14 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION 31
15 ASSAY PROCEDURE 32

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

Deutsch - Gebrauchsanweisung

Anti-Pseudomonas aeruginosa IgG ELISA E15	**3x96 Bestimmungen**	
CE	DE/CA40/00809/7	
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay	
Dauer (Inkubationszeit)	4,5 h	
Antigen	Alkalische Protease, Elastase, Exotoxin A	
Puffer	Gebrauchsfertig/ 20x Konzentrat	
Positiv- und Negativkontrolle	Humanes Serum	
Probe	Humanes Serum / EDTA-Plasma	
Erforderliches Probenvolumen	10 µL	
Proben Verdünnung	1:1000	
Intra- / Interassay Variation AP/ ELA/ Exo A bei > 1250 [1/Titer]	ø < 20 %	
Ergebnisanalyse	Cut-Off Werte	Testergebnis
	< 1:500	negativ
	500 - 1250	grenzwertig
	> 1250	positiv
Diagnostische Sensitivität [%][1]	ø 84 (Bereich 66-96)	
Diagnostische Spezifität [%][1]	ø 76 (Bereich 48-96)	
[1)]Mittelwert aus	Kappler et al., Thorax 2006 Tramper-Stranders et al., Thorax 2006 Ratjen et al. Pediatric Pulmonol 2007 Dogru et al. Turkish Journal of Pediatrics 2013 Anstead et al J Cystic Fibrosis 2012 Daines et al J Cystic Fibrosis 2014	

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

1 ZWECKBESTIMMUNG

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

2 EINFÜHRUNG

Pseudomonas aeruginosa, ein Gram-negatives Bakterium, das ubiquitär in Feuchtreservoiren unserer Umgebung vorkommt, verursacht ca. 10 % aller nosokomialen Infektionen. Der opportunistisch-pathogene Erreger führt zu akuten und chronischen Infektionstypen in verschiedenen Organen suszeptibler Patientengruppen. Chronische Lungeninfektionen bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) sind sehr häufig, können in frühester Kindheit auftreten und bestimmen die Lebenserwartung dieser Patienten.

Die P. aeruginosa Infektion verursacht einen Anstieg von Antikörpern gegen eine große Zahl von P. aeruginosa Antigenen in CF Patienten. Unser sensitives Antikörperdetektionssystem diskriminiert zwischen infizierten und nicht-infizierten Patientengruppen, so dass es eine gute Ergänzung zur mikrobiologischen Diagnostik darstellt, die durch die Probenahme beeinflusst werden kann (z.B. Rachenabstrich).

Je nach Erregerstamm und Immunantwort des Patienten können Antikörper gegen einzelne oder auch alle drei Antigene gleichzeitig festgestellt werden. Ein Patient ist seropositiv, wenn die Probe auf ein oder mehrere Antigene positiv reagiert.

3 TESTPRINZIP

Die Mediagnost Anti-Pseudomonas aeruginosa-IgG-ELISA, E15, ist ein Sandwich-Enzym-Immunoassay. Verdünnte Seren werden in die Vertiefungen der Testplatten pipettiert, die mit den *P. aeruginosa* Antigenen **alkalische Protease (AP), Elastase (ELA) und Exotoxin A (Exo A)** beschichtet sind. Die spezifischen Antikörper der Seren werden gebunden. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei 37°C werden die Testplatten gewaschen und die Antikörper mit Peroxidase konjugierten anti-human-IgG-spezifischen Antikörpern (Konjugat) markiert (Inkubationszeit 2 Stunden bei 37°C). Nach erneutem Waschen wird das Substrat zugegeben, das vom Konjugat zu einem dunkelblauen Farbstoff umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet, dabei schlägt die dunkelblaue Farbe nach Gelb um. Die Farbreaktion wird photometrisch gemessen und ausgewertet. Die Farbintensität korreliert mit der Antikörperkonzentration in der Probe.

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

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

VORSICHT: Dieser Test enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Tests 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. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Nachfrage verfügbar.

Menschliches Serum
in folgenden Komponenten enthalten: **PC1, PC2, PC3, NC, CTR**
Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefiziens-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.

4.1 Komponenten

Im Folgenden werden alle Komponenten des Produktes aufgeführt, die Gefahrstoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen entsprechend der Europäischen Verordnung 1272/2008 enthalten:

Verdünnungspuffer DIL / Antikörper-POD-Konjugat DET / Positivkontrolle PC / Negativkontrolle NC / Kontrolle CTR
Die Puffer enthalten die nachfolgend aufgeführten gefährlichen Inhaltsstoffe, darauf basierend ergibt sich die folgende Kennzeichnung der beiden Gemische:

Gefahrenpiktogramme (CLP):	GHS07
Signalwort (CLP):	Achtung
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (< 0,06 %) Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1) (< 0,015 %)
Gefahrenhinweise (CLP):	H317 - Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
Sicherheitshinweise (CLP):	P280 - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz tragen. P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P261 - Einatmen von Nebel/Dampf/Aerosol 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 - Inhalt/Behälter gemäß nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

Waschpuffer WB
Der Puffer enthält als Konservierungsmittel eine Mischung aus 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0,015 %).

EUH208	Enthält Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

Stopplösung STB
Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure.

EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

4.2 Schutzausrüstung und Erste-Hilfe Maßnahmen

Nach Hautkontakt:	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen oder duschen. Bei Hautreaktion Arzt aufsuchen.
Nach Augenkontakt:	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei Augenreizung einen Augenarzt aufsuchen.
Nach Verschlucken:	Bei Unwohlsein Arzt anrufen.

Kontakt mit den Inhaltstoffen ist zu vermeiden. Detaillierte Informationen zur persönlichen Schutzausrüstung und zu Erste-Hilfe-Maßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zum Anti-Pseudomonas aeruginosa IgG ELISA E15 zu entnehmen. Dieses kann elektronisch über die Website der Mediagnost GmbH unter www.mediagnost.de abgerufen werden oder wird auf Anfrage über contact@mediagnost.de zur Verfügung gestellt.

Exemplary Version, not for assay documentation / Exemplarische Version, nicht für Assaydurchführung verwenden

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und EDTA-Plasma

5.2 Probenentnahme

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

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschlossenen, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20°C - 25°C mind. 2 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 3

Es wird empfohlen, die Proben sobald wie möglich nach der Trennung von koagulierten und / oder korpuskulären Bestandteilen bei -20°C zu lagern und Gefrier-Tau Zyklen zu vermeiden.

5.5 Probenverdünnung

Die Verdünnung der Proben sollte in PE/PP-Gefäßen erfolgen. Bei größeren Serien empfiehlt sich der Gebrauch eines Multi-Steppers. Die Proben müssen vor jedem Verdünnungsschritt gut gemischt werden. Sollte die Extinktion der Probe die Extinktion der Positivkontrolle überschreiten, muss die Messung zur genauen Titerbestimmung mit einer stärker verdünnten Probe bzw. seriell in drei Stufen verdünnten Proben (1:1000, 1:10000 und 1:100000) wiederholt werden.

Empfohlene Verdünnung: **1:1000** mit Verdünnungspuffer **DIL**.

Exemplarisches Verdünnungsprotokoll

1:10 Vorverdünnung
90 µL Verdünnungspuffer **DIL** + **10 µL** Serum- oder EDTA-Plasma

Die vorverdünnte Probe sollte dann wie folgt verdünnt werden:

1:1000 Verdünnung
10 µL von der 1:10 vor-verdünnten Probe in **990 µL** Verdünnungspuffer **DIL** geben

1:10000 Verdünnung
100 µL von der 1:1000 verdünnten Probe in **900 µL** Verdünnungspuffer **DIL** geben

1:100000 Verdünnung
100 µL von der 1:10000 verdünnten Probe in **900 µL** Verdünnungspuffer **DIL** geben

Nach dem Mischen bitte innerhalb von 1 Stunde von der jeweilig benötigten Verdünnung 100 µL pro Vertiefung im Assay einsetzen (Pipettierkontrolle = orange Farbe der Lösung in der Mikrotiterplattenvertiefung).

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

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 3x96 Tests. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind einzeln abbrechbar.

AP	**Mikrotiterplatte 1,** gebrauchsfertig, beschichtet mit **alkalischer Protease, rot markiert**.	**(8x12) Vertiefungen**
ELA	**Mikrotiterplatte 2,** gebrauchsfertig, beschichtet mit **Elastase, blau markiert**.	**(8x12) Vertiefungen**
Exo A	**Mikrotiterplatte 3,** gebrauchsfertig, beschichtet mit **Exotoxin A, grün markiert**.	**(8x12) Vertiefungen**
PC1	**Positivkontrolle 1**, gebrauchsfertig, kalibriertes Kontrollserum für Anti-alkalische Protease **AP, rot markiert,** mit Titer von 1:2500.	**1 x 1,5 mL**
PC2	**Positivkontrolle 2**, gebrauchsfertig, kalibriertes Kontrollserum für Anti-Elastase **ELA, blau markiert,** mit einem Titer von 1:2500.	**1 x 1,5 mL**
PC3	**Positivkontrolle 3**, gebrauchsfertig, kalibriertes Kontrollserum für Anti-Exotoxin A, **Exo A, grün markiert,** mit einem Titer von 1:2500.	**1 x 1,5 mL**
NC	**Negativkontrolle**, gebrauchsfertig, enthält humanes Serum und ist nicht reaktiv für Pseudomonas aeruginosa Antigene.	**2 x 1,5 mL**
CTR	**Kontrolle**, gebrauchsfertig, enthält humanes Serum und muss im Test als grenzwertig bestimmt werden.	**2 x 1,5 mL**
DET	**Antikörper-POD-Konjugat**, 100fach **konzentriert,** enthält Meerrettich-Peroxidase (POD) markiertes anti-human IgG.	**2 x 250 µL**
DIL	**Verdünnungspuffer**, gebrauchsfertig.	**3 x 50 mL**
WB	**Waschpuffer**, 20fach **konzentrierte** Lösung.	**1 x 120 mL**
S	**Substrat** für Meerrettich Peroxidase (POD), gebrauchsfertig, stabilisiertes Tetramethylbenzidin (TMB).	**1 x 33 mL**
STP	**Stopplösung**, gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	**1 x 33 mL**
CF	**Abdeckfolie** für die **Mikrotiterplatte**	**6 x**
CERT	**Chargenzertifikat**	**1 x**

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

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) **(A. dest.),** 2400 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm
- Inkubator **37°C**

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen
Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2°C - 8°C bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

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°C - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden.

Vorbereitung der Reagenzien
Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20°C - 25°C gebracht werden. Die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern dürfen nicht vermischt werden.

Verdünnung der Reagenzien
Für die Verdünnung (1:100) des Antikörper-POD-Konjugats **DET** wird der Verdünnungspuffer **DIL** verwendet. Verdünnte Konjugatgebrauchslösung ist **nur nach Bedarf ansetzen**.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist nur **4 Wochen** haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Testdurchführung
Bei der **Testdurchführung** sollten die Kontrollen **PC, NC und CTR** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das verdünnte Antikörper-POD-Konjugat **DET** sowie nachfolgend das Substrat **S** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung **STP** in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie das Substrat auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Inkubation
Probeninkubation: 2 h bei 37°C, **Konjugat Inkubation** 2 h bei 37°C,
Substrat Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur. Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich, Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt. **Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.**

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 **WB** 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 fusselndem Zellstoff.

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

Exemplary Version - not set for assay accomplishment. Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung verwenden

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien:		**Verdünnung:**
DET	**Antikörper-POD-Konjugat Konzentrat (100x)**	**1:100 in Verdünnungspuffer DIL** ➔ **DET 1:100**
WB	**Waschpuffer Konzentrat (20x)**	**1:20** mit **Aqua dest.** (z.B. 100 mL **WB** mit **A.dest** auf 2000 mL auffüllen) ➔ **WB 1:20**
Die Seren **1:1000** mit Verdünnungspuffer verdünnen (qualitativer Test). Bei quantitativer Antikörperbestimmung empfiehlt sich eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungen **1:1000**, **1:10000**, **1:100000**.		
Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.		

Testdurchführung in Doppelbestimmung:				
Pipettieren	**Reagenzien**	**Mikrotiterplatte 1 AP**	**Mikrotiterplatte 2 ELA**	**Mikrotiterplatte 3 Exo A**
100 µL	Negative Kontrolle **NC**	A1/A2	A1/A2	A1/A2
100 µL	Positive Kontrolle **PC1**	B1/B2	--	--
100 µL	Positive Kontrolle **PC2**	--	B1/B2	--
100 µL	Positive Kontrolle **PC3**	--	--	B1/B2
100 µL	Kontrolle **CTR**	C1/C2	C1/C2	C1/C2
100 µL	Probenverdünnung	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren		
Mit Klebefolie die Vertiefungen von den **3 Mikrotiterplatten** dicht abdecken.				
Inkubation: **2 h bei 37°C**				
3x 300 µL	Absaugen und die Platte **3x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20**/ Vertiefung waschen.			In jede Vertiefung
100 µL	Verdünntes Antikörper-POD-Konjugat **DET 1:100**			In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen von den **3 Mikrotiterplatten** dicht abdecken.				
Inkubation: **2 h bei 37°C**				
3x 300 µL	Absaugen und die Platte **3x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20**/ Vertiefung waschen.			In jede Vertiefung
100 µL	Substrat **S**			In jede Vertiefung
Inkubation: **30 Minuten** im Dunklen **bei Raumtemperatur (20 - 25°C)**				
100 µL	Stopplösung **STP**			In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von **30 min** bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).				

Exemplary Version - not for assay a... -nicht für Assaydurchführung verwenden

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Messung Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln. Die Kit-Kontrolle muss innerhalb des zulässigen Bereichs, der auf dem QC-Zertifikat angegeben worden ist, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test nicht valide und muss wiederholt werden. Ferner muss der Anwender die GLP-Regeln (Good Laboratory Practice) und andere einschlägige Normen und Gesetze beachten.

9.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass **die Extinktionen** der Negativkontrollen **NC 0,25 Einheiten nicht überschreiten**. Die **Differenz der Extinktionen** zwischen den Negativkontrollen **NC** sowie der jeweiligen Positivkontrollen **PC** sollte **mindestens 0,6 Einheiten** betragen.

10 AUSWERTUNG

10.1 Berechnung der Ergebnisse

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

10.2 Qualitative Bestimmung:

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

Der Grenzwert (cut-off) beträgt 20 % des Extinktionswertes der positiven Kontrolle PC. 1:1000 verdünnte Proben, die eine geringere Extinktion aufweisen, sind als **negativ** einzustufen. Der Antikörpertiter liegt unter 1:500.

1:1000 verdünnte Proben, die eine Extinktion im Bereich von ≥ 20 % aber < 50 % der positiven Kontrolle PC aufweisen, können nicht eindeutig klassifiziert werden und sind daher als **grenzwertig** zu beurteilen.

1:1000 verdünnte Proben, deren Extinktion ≥ 50 % der PC Extinktion ist, sind als **positiv** zu klassifizieren.

Beispiel für die Auswertung

Negativkontrolle NC	Extinktion
1.Wert	0,041
2.Wert	0,056
Mittelwert	**0,049**

Positivkontrolle PC	Extinktion
1.Wert	1,120
2.Wert	1,136
Mittelwert	**1,128**

Berechnung für die qualitative Bestimmung:

PC – NC : 1,128 – 0,049 = 1,079
Cut-off (20 % von PC - NC) : 0,2 × 1,079 = 0,216
Grenzwertig (50 % von PC - NC) : 0,5 × 1,079 = 0,540

Alle Proben mit einer Extinktion < 0,216 sind damit bzgl. des Gehaltes an Anti-P.aeruginosa IgG als negativ anzusehen. Proben mit einer Extinktion von > 0,216 und < 0,540 werden als grenzwertig beurteilt und Proben mit einer Extinktion von > 0,540 als positiv bzgl. des Gehaltes an Anti-P.aeruginosa IgG.

10.3 Quantitative Bestimmung:

Die Auswertung erfolgt graphisch oder über ein entsprechendes Auswertprogramm. Die Extinktionen der negativen NC und positiven PC Kontrolle (y-Achse) werden in einem doppelt linearen Koordinatensystem gegen einen Titer-Faktor, NC = 0 und PC = 2,5 auf der x-Achse eingetragen. Für die Quantifizierung der Seren Messwerte wird eine Gerade durch die Messwerte von NC und PC gelegt und bis Faktor 3,5 verlängert.

Zur Bestimmung des Titers eines Serums wird vom Messwert der Serumprobe über die Gerade NC - PC der Titer-Faktor ermittelt und **mit dem Verdünnungsfaktor** des Serums **multipliziert.**

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

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment
...ische Version, nicht für Assaydurchführung verwenden

Beispiel für die Auswertung

Negativkontrolle NC	Extinktion
1.Wert	0,041
2.Wert	0,056
Mittelwert	**0,049**

Positivkontrolle PC	Extinktion
1.Wert	1,220
2.Wert	1,176
Mittelwert	**1,198**

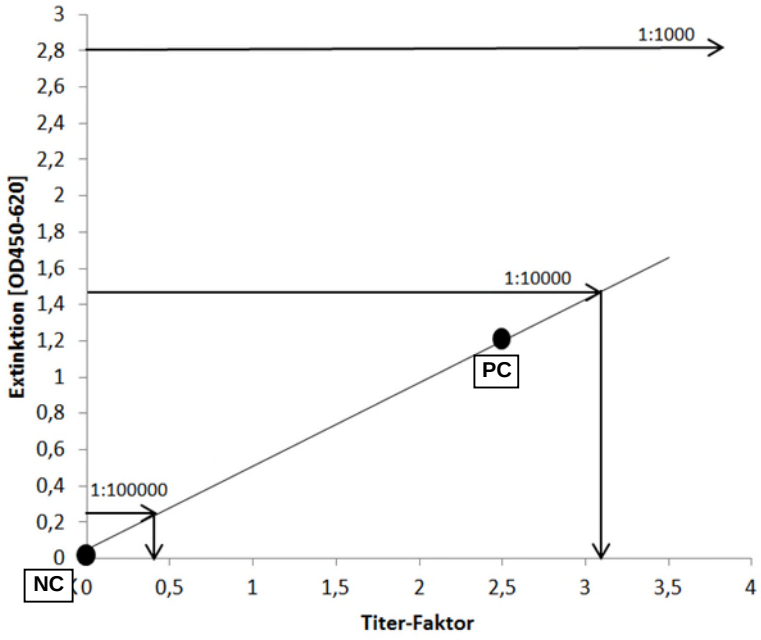


Abbildung 1 Beispielhafte Grafik der Auswertung für Serum B.

Probe	Proben-verdünnung	Extinktion (OD) (Mittelwert)	Titerfaktor nach Graphik	Titer	Bewertung
Serum B	1:1000	2,82	> 3,5	n.a.	positiv
	1:10000	1,45	3,05	1:(10000 x 3,05) => 1:30.500	positiv
	1:100000	0,210	0,3	1:(100000 x 0,3) => 1:30000	positiv

Wird ein **elektronisches Auswerteprogramm** genutzt, so werden NC und PC mit den Titerwerten 0 und 2500 als Standards definiert. Das Programm berechnet dann den Titer der unbekannten Probe, dabei muss der Verdünnungsfaktor der Probe entsprechend berücksichtigt werden.

10.4 Interpretation der Ergebnisse

Der Test dient als Ergänzung zum klassischen mikrobiologischen Nachweis einer Infektion mit Pseudomonas aeruginosa. Wenn eine Probe auf Antikörper gegen **eines der drei** Pseudomonas aeruginosa Exotoxine positiv getestet wurde, deutet dies auf eine entsprechende Infektion hin. Die Bewertung der gemessenen Antikörpertiter erfolgt entsprechend des untenstehenden Schemas. In der Literatur sind dabei verschiedene Untersuchungen zur diagnostischen Wertigkeit des Testsystems beschrieben (vgl. Tabelle 5), in diesen wurde häufig auf eine Differenzierung zwischen grenzwertig und positiv verzichtet und Antikörpertiter >1:500 als positiv klassifiziert.

Titer	Bewertung
< 1:500	negativ
1:500 bis 1: 1250	grenzwertig
> 1:1250	positiv

Bei der Bewertung des Testergebnisses sind die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Testsystems zu berücksichtigen (s. Kapitel 12.7).

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

Das Testergebnis allein sollte daher nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Es wird empfohlen, die internationalen und nationalen Richtlinien für Diagnostik und Behandlung zu berücksichtigen.

11 EINSCHRÄNKUNGEN

Grundsätzlich kann das Ergebnis von immunologischen Testsystemen durch verschiedene Probenbestandteile wie z.B. Medikamente oder Lipide beeinflusst werden. Über das Assay Design werden diese Einflüsse minimiert, können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Bewertung der Ergebnisse muss vor dem Hintergrund der diagnostischen Sensitivität und Spezifität des Testsystems (Tabelle 5) erfolgen. Bei akut und auch chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten kann bei Immuninsuffizienz die Bewertung über den Antikörpertiter unzureichend ausfallen.

12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

12.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität als ein Maß für die minimale Menge an spezifischem Antikörper, die in diesem Testsystem nachweisbar ist, wurde durch die Signalvariabilität der Negativkontrolle bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die Nachweisgrenze der Antikörpertiter für AP, ELA, Exo A für 1:1000 verdünnten Proben liegt bei < 1:300.

Tabelle 1 Die analytische Sensitivität/ Nachweisgrenze, bezogen auf das 3fache Standardabweichung des Leerwertes. Gezeigt wird der zurückberechnete Antikörpertiter. aus drei unabhängigen Experimenten.

Verdünnung	AP	ELA	Exo A
-	0,105	0,268	0,181
1:100	10	27	18
1:1000	105	268	181

12.2 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wurde durch die Auswertung des mikrobiologischen Status von serologisch und mikrobiell Pseudomonas-negativen Patienten mit zystischer Fibrose untersucht. Häufig festgestellt wurden Infektionen mit Staphylococcus aureus, Candida albicans und Hemophilus influenza. Diese Infektionen führten nicht zur Bildung von Antiköpern, die an die Pseudomonas aeruginosa Antigene binden.

12.3 Präzision

Intra-Assay Variabilität

Serum Proben wurden 1:1000 verdünnt und 16-mal in einem Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 gezeigt. Die mittlere Varianz betrug 4,95 / 4,49 und 8,41 % für alkalische Protease, Elastase und Exotoxin A.

Tabelle 2 Intra-Assay Varianz

	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	AP	**ELA**	**Exo A**	**AP**	**ELA**	**Exo A**	**AP**	**ELA**	**Exo A**
Mittelwert Titer	**806**	**529**	**715**	**3858**	**5521**	**5673**	**1453**	**1530**	**1381**
SA	35	43	91	173	135	127	88	44	142
VK [%]	4,3	8,14	12,71	4,47	2,45	2,25	6,08	2,86	10,29
Anzahl [n]	16	16	16	16	14	16	16	16	16

Inter-Assay Variabilität

Drei Proben wurden portioniert und bis zu 12 Jahren bei -20°C gelagert und unregelmäßig während dieser Zeit gemessen. Die zusammengefassten Ergebnisse für die drei

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

verschiedenen Proben sind in der Tabelle 3 dargestellt. Der Variationskoeffizient VK betrug für jede Probe und jedes Antigen < 20 %.

Tabelle 3 Inter-Assay Varianz

	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	AP	**ELA**	**Exo A**	**AP**	**ELA**	**Exo A**	**AP**	**ELA**	**Exo A**
Mittelwert Titer	**1041**	**958**	**804**	**1743**	**1519**	**1239**	**2971**	**4071**	**4343**
SA	67	60	70	228	231	176	164	309	392
VK [%]	6,39	6,31	8,69	13,09	15,22	14,22	5,51	7,59	9,03
Anzahl [n]	73	73	72	295	295	293	112	112	112

12.4 Linearität

Anhand drei Serumproben (hohe, mittlere und niedrige Antikörpertiter) wurde die Linearität der Proben untersucht. Die Ergebnisse, d.h. die gemessenen Signale in Abhängigkeit von der Probenverdünnung werden in der Abbildung 2 dargestellt. Die lineare Regressionsanalyse ergab für alle getesteten Proben einen Korrelationskoeffizienten von > 0,9. Die Antikörpertiter zeigten auch eine gute Linearität.

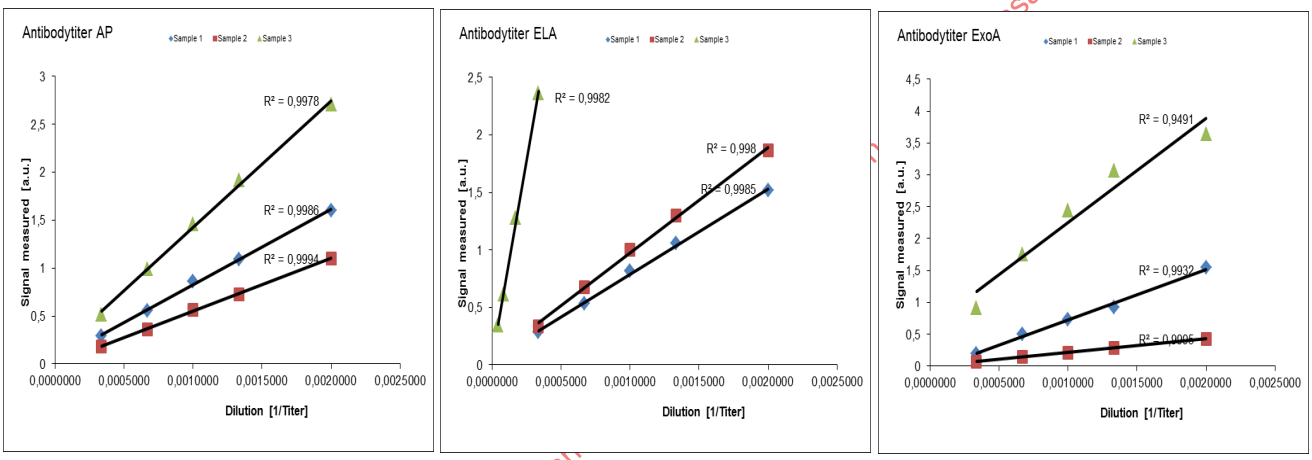


Abbildung 2 Linearität der Probenverdünnung. Proben mit hohem, mittlerem und niedrigem Antikörpertiter wurden (1:500 - 1: 24000) verdünnt. Die Korrelation zwischen den erwarteten und und gemessenen Signal-intensitäten wurden durch die lineare Regressionsanalyse berechnet.

12.5 Interferenz

Interferenz wurde nicht untersucht. Es stehen keine Informationen über den Einfluss von Triglyceriden, Hämoglobin oder Bilirubin auf die Titermessung zur Verfügung. Daher sollten lipämische, hämolytische oder ikterische Proben nicht für diesen Test verwendet werden.

12.6 Rückführbarkeit / Testkalibrierung

Eine internationale Standardpräparation ist nicht verfügbar, weder sind gereinigte menschliche Anti-Pseudomonas aeruginosa-Antikörper kommerziell erhältlich noch eine etabilierte Referenzmethode zur Messung dieser Antikörper. Somit wird der Assay basierend auf der Positivkontrolle des Herstellers mit einem arbiträrem Antikörpertiter von 2500 (Mediagnost [1/Titer]) kalibriert. Für die Assayproduktion und Qualitätskontrolle werden ausgewählte Humanserumproben mit definiertem Antikörpergehalt eingesetzt. Dieses Panel ermöglicht die Rückführbarkeit der Messergebnisse.

12.7 Diagnostische Qualität

Zur Beurteilung der diagnostischen Sensitivität (richtig positiv) und Spezifität (richtig negativ) wurde ein Vergleich von E15 Titerergebnissen in Serumproben und dem mikrobiologischen Nachweis von Pseudomonas aeruginosa Wachstum in Rachenabstrichproben durchgeführt. Für die Beurteilung der Testergebnisse wurde nur zwischen positiv und negativ bezüglich einer Pseudomonas aeruginosa Infektion unterschieden:

Leerplatz, Variante nicht für Assay verwendet

Positiv

Mindestens ein mikrobiologischer Nachweis in Rachenabstrichproben von Pseudomonas aeruginosa innerhalb von 12 Monaten vor der Serumprobe wurde gesammelt.

Negativ

Kein mikrobiologischer Nachweis von Pseudomonas aeruginosa in Rachenabstrichproben innerhalb von 12 Monaten vor der Serumprobe wurde gesammelt.

Tabelle 4 Diagnostische Spezifität und Sensitivität Hier werden die absoluten Zahlen der positiven und negativen Ergebnisse in Bezug auf den mikrobiologischen Goldstandard für verschiedene Cut-off-Werte (AP: alkalische Protease, ELA: Elastase; Exo A: Exotoxin A; Total: alle drei Antigene) gezeigt. Auf Basis von absoluten Zahlen wurden die Sensitivität (% richtig positiv) und die Spezifität (% richtig negativ) berechnet.

Cut-off	1:100				1:500				1:1250			
	AP	**ELA**	**Exo A**	**Total**	**AP**	**ELA**	**Exo A**	**Total**	**AP**	**ELA**	**Exo A**	**Total**
Richtig Positiv **RP**	39	40	43	45	27	31	27	40	19	23	19	32
Falsch Positive **FP**	10	8	11	12	2	2	3	5	1	0	0	1
Richtig Negative **RN**	16	18	15	14	24	24	23	21	25	26	26	25
Falsch Negative **FN**	12	11	8	6	24	20	24	11	32	28	32	19
Sensitivität [%] RP/(RP+FN)	76	78	84	88	53	61	53	78	37	45	37	63
Spezifität [%] RN/(RN+FP)	62	69	58	54	92	92	88	81	96	100	100	96

Eine Population von 77 Patienten mit Mukoviszidose wurde untersucht. Bevor die Serumprobe gesammelt wurde, waren 51 Patienten mikrobiell positiv und 26 negativ für Pseudomonas aeruginosa. Diese Ergebnisse entsprechen den von Kappler et al. veröffentlichten Daten 2006. Hier verwendeten die Autoren einen Titer cut-off von 500 und berechneten eine Gesamtsensitivität von 86% und eine Spezifität von 96%. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität für AP 64%; für ELA 53% und für Exo A 73 % betrug. Die berechneten Spezifitäten für AP, ELA und Exo A betrugen 99%, 100% und 96 %. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen ermittelten Kappler et al. höhere Werte für Sensitivität und Spezifität, die wahrscheinlich die Folge einer höheren Probenanzahl (183 versus 77) ist.

Das Mediagnost Testsystem wurde von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen im Hinblick auf seine diagnostische Sensitivität und Spezifität bewertet. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Mittlere diagnostische Spezifität beträgt 76 % (48 - 96) und mittlere diagnostische Sensitivität beträgt 84 % (66 bis 96).

Tabelle 5 Die Zusammenfassung der Literatur Ergebnisse beschreiben die diagnostische Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit vom angelegten Cut-off-Wert.

Autor	Journal	Jahr	Assay	Patient [n]	Titer Cut-off	Diagnostische Sensitivität [%]	Diagnostische Spezifität [%]
Kappler et al.	Thorax	2006	AP/ Ela/ Exo A Mediagnost	183	500	86	96
Tramper-Stranders et al.	Thorax	2006	AP/ ELA/ Exo A Mediagnost	220 220	1250 500 AP > 0 ELA > 35 Exo A > 0	66 79 96	96 89 79
Ratjen et al.	Pediatric Pulmonol	2007	AP/ELA/Exo A	375	AP > 285 ELA > 300 Exo A >1000	92,7	93,3
Dogru et al.	Turkish Journal of Pediatrics	2013	AP/ ELA/ Exo A Mediagnost	90	500	87,5	70
Anstead et al.	J Cystic Fibrosis	2013	AP/ ELA/ Exo A Mediagnost	304	100	78	48
Daines et al.	J Cystic Fibrosis	2014	AP/ ELA/ Exo A Mediagnost	68	100	66	56

Version not for assay accomplishment / Exemplar-Version nicht für Assay-Durchführung verwenden

ENGLISH - INSTRUCTIONS FOR USE

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH - Instructions for use 18
1 INTENDED USE 18
2 INTRODUCTION 18
3 PRINCIPLE 19
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 20
5 SAMPLES 21
6 MATERIALS 22
7 TECHNICAL NOTES 23
8 ASSAY PROCEDURE 24
9 QUALITY CONTROL 24
10 EVALUATION OF RESULTS 25
11 LIMITATION OF PROCEDURE 27
12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 27
13 LITERATUR / LITERATURE 30
14 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION 31
15 ASSAY PROCEDURE 32

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

ENGLISH - Instructions for use

Anti-Pseudomonas aeruginosa IgG ELISA E15	**3x96 Determinations**	
CE	DE/CA40/00809/7	
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay	
Duration (incubation period)	4.5 h	
Antigen	Alkaline Protease, Elastase, Exotoxin A	
Buffer	Ready-for-use/ 20x concentrate	
Positive and Negative Control	Human Serum	
Sample	Human Serum/ EDTA-Plasma	
Sample Volume	10 µL	
Sample Dilution	1:1000	
Intra- / Inter-Assay Variance AP/ELA/Exo A > 1250 [1/Titre]	ø < 20%	
Result evaluation	Cut-Off Values	Test Result
	< 1:500	Negative
	500 - 1250	Borderline
	> 1250	Positive
Diagnostic sensitivity [%][1]	ø 84 (Range 66 – 96)	
Diagnostic specificity [%][1]	ø 76 (Range 48 – 96)	
[1)]Mean value from	Kappler et al., Thorax 2006 Tramper-Stranders et al., Thorax 2006 Ratjen et al. Pediatric Pulmonol 2007 Dogru et al. Turkish Journal of Pediatrics 2013 Anstead et al J Cystic Fibrosis 2012 Daines et al J Cystic Fibrosis 2014	

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

1 INTENDED USE

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

2 INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa, a Gram-negative bacterium ubiquitously distributed in the moist environment, causes about 10% of all nosocomial infections. This opportunistic pathogen leads to acute and chronic types of infection within various organs of susceptible patient groups. Chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis (CF) is very frequent, may start early in infancy and determines the life expectancy of these patients. *P. aeruginosa* infection provokes a production of antibodies to a large number of *P. aeruginosa* antigens in CF patients. **Mediagnost's** sensitive antibody detection system is an aid to discriminate between infected and uninfected patient groups.

Thus, the test is a supplement of microbiological diagnostics, which can be influenced by sampling technique (e.g. throat swab).
Depending on the *Pseudomonas aeruginosa* species and the patient's immune reaction, antibodies can be detected against a single, two or even all three antigens simultaneously. A patient is regarded as sero-positive when the serum is positive for one or more of the antigens.

3 PRINCIPLE

The **Mediagnost Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG ELISA, E15,** is a sandwich enzyme immunoassay. Serum or plasma samples are diluted and added to the wells of a microtiter plate, which have been previously coated with the *Pseudomonas aeruginosa* antigens alkaline protease, elastase or exotoxin A. Specific antibodies in the sample bind to the respective antigens during an incubation of 2 h at 37°C. After washing, the conjugate (anti-human IgG peroxidase-labelled immunoglobulin) is added and incubated again 2 h at 37°C. After a final washing step, substrate is added and incubated for 30 min at room temperature. The color forming reaction is terminated on addition of stop solution accompanied by a color change from blue to yellow. The absorbance of the coloured reaction product is measured on a microtiter plate reader. The colour intensity of the reaction corresponds to the concentration of antibodies in the sample.

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

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic 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 expired or obviously damaged or microbial contaminated or spilled material.

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

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

Human Serum
Following components contain human serum: **PC1, PC2, PC3, NC, CTR**
Source human serum for the control sera provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient´s specimens should be treated as potentially infectious.

4.1 Components

All components of the product that contain hazardous substances in declarable concentrations in accordance with European Regulation 1272/2008 are listed below:

Dilution Buffer DIL / Antibody-HRP-Conjugate DET / Positive Control PC / Negative Control NC / Control CTR
The buffers contain the hazardous ingredients listed below, based on this the following labeling of the two mixtures results:

Hazard pictograms (CLP):

GHS07

Signal word (CLP):	Warning
Hazardous components:	2-methylisothiazol-3(2H)-one (< 0,06 %) reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (< 0,015 %)
Hazard statements (CLP):	H317 - May cause an allergic skin reaction.
Safety instructions (CLP):	P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearingprotection. 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 Water. P501 - Dispose of contents/container in accordance with national disposal regulations.

Washing Buffer WB
The buffer contains a mixture of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0.015 %) as a preservative.

EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
EUH210	Safety data sheet available on request.

Stop Solution STP
The stop solution contains 0.2 M sulphuric acid.

EUH210	Safety data sheet available on request.

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

4.2 Protective equipment and first aid measures

After contact with skin:	Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower. In case of skin reactions, consult a physician.
After contact with eyes:	Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. In case of eye irritation consult an ophthalmologist.
After ingestion:	Call a doctor if you feel unwell.

Avoid contact with the ingredients. Detailed information on personal protective equipment and first aid measures can be found in the safety data sheet for Anti-Pseudomonas aeruginosa IgG ELISA E15. This can be accessed electronically via the Mediagnost GmbH website at www.mediagnost.de or will be made available on request via contact@mediagnost.de.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and EDTA-Plasma samples

5.2 Specimen collection

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

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

In firmly closed sample vials:

- Storage at 20-25°C: at least 2 days
- Storage at -20°C: at least 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

After the separation of coagulated and / or corpuscular components, it is recommended to store the samples as soon as possible at -20°C and to avoid freeze-thaw cycles.

5.5 Sample dilution

Samples should be diluted in PE/PP-tubes. For larger sample numbers usage of a multi-stepper is recommended. If the signal of the sample exceeds the signal of the positive control (PC), the measurement must be repeated for an exact titer result with a higher diluted sample e.g. in three dilutions (1:1000; 1:10000 and 1:100000)**.**

Recommended dilution: **1:1000** with Dilution Buffer **DIL**.

Exemplary Dilution Protocol

1:10 Pre-Dilution
90 µL Dilution Buffer **DIL** + **10 µL** Serum- oder EDTA-Plasma

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

1:1000 Dilution
Add **10 µL** of the 1:10 pre-diluted sample to **990 µL** Dilution Buffer **DIL**

1:10000 Dilution
Add **100 µL** of the 1:1000 dilution to **900 µL** Dilution Buffer **DIL**

1:100000 Dilution
Add **100 µL** of ther 1:10000 dilution to **900 µL** Dilution Buffer **DIL**

After mixing use **100 µL** each of the needed sample dilution per well within 1 hour (Pipetting control = orange color of the solution in the microtiter plate well).

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

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 3x96 tests. The microtiter plates are divided up in 12 strips with separately breakable wells.

AP	**Microtiter plate 1,** ready for use: coated with alkaline Protease, **labelled red**.	**(8x12) Wells**
ELA	**Microtiter plate 2**, ready for use: coated with Elastase, **labelled blue**.	**(8x12) Wells**
Exo A	**Microtiter plate 3,** ready for use: coated with Exotoxin A, **labelled green**.	**(8x12) Wells**
PC1	**Positive Control 1**, ready for use, calibrated control serum for alkaline Protease, AP, **red labelled**, shows a titer of 1:2500.	**1 x 1.5 mL**
PC2	**Positive Control 2**, ready for use, calibrated control serum for Elastase, ELA, **blue labelled**, shows a titer of 1:2500.	**1 x 1.5 mL**
PC3	**Positive Control 3**, ready for use, calibrated control serum for Exotoxin A, Exo A, **green labelled**, shows a titer of 1:2500.	**1 x 1.5 mL**
NC	**Negative Control**, ready for use, contains human serum, **not reactive** for Pseudomonas aeruginosa antigens.	**2 x 1.5 mL**
CTR	**Control,** ready for use, contains human serum and has to be determinated as **borderline** for Pseudomonas aeruginosa antigens in the assay.	**2 x 1.5 mL**
DET	**Antibody-HRP-Conjugate**, **100-fold concentrated**, contains horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-human IgG.	**2 x 250 µL**
DIL	**Dilution Buffer**, read for use.	**3 x 50 mL**
WB	**Washing Buffer,** 20-fold **concentrated** solution.	**1 x 120 mL**
S	**Substrate** for horseradish peroxidase (HRP), ready for use, stabilised Tetramethylbencidine (TMB).	**1 x 33 mL**
STP	**Stop Solution,** ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	**1 x 33 mL**
CF	**Cover Foil,** for covering the **microtiter plate.**	**6 x**
CERT	**Lot Certificate**	**1 x**

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

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (A. dest.), 2400 mL.**
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥590 nm
- Incubator **37°C**

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions
Store the kit at **2-8°C** until its expiry date.

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.

Preparation of reagents
Bring all reagents to room temperature **(20°C - 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 DIL** for the **1:100** dilution of **Antibody-HRP-Conjugate DET.** Please dilute only according to daily requirements.

The required volume of Washing Buffer WB is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with Aqua dest. The **1:20** diluted Washing Buffer **WB** is stable **4 weeks at 2-8°C**. Please dilute only according to daily requirements.

Assay Procedure
When performing the assay, Controls **CTR, PC, NC** and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g., 15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times the diluted Antibody-HRP-Conjugate **DET** and the **Substrate S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop Solution STP** should be added to the plate in the same order as the Substrate **S.**

Incubation
Sample Incubation: 2 h at 37°C, Conjugate Incubation 2 h at 37°C, Substrate Incubation: 30 min at room temperature 20°C - 25°C. The Substrate **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive: storage and incubation in the dark.

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

Washing
Proper washing is of 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 **WB** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

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

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

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

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of Reagents		Dilution
DET	**Antibody-HRP-Conjugate Concentrate (100x)**	**1:100** in Dilution Buffer **DIL** ➔ **DET 1:100**
WB	**Washing Buffer Concentrate (20x)**	**in Aqua dest.** (z.B. 100 mL **WB** mit **A.dest** auf 2000 mL auffüllen) ➔ **WB 1:20**
Dilute samples **1:1000** with Dilution Buffer **DIL** (qualitative test). For quantitative antibody assays it is recommended to perform serial dilutions of **1:1000**, **1:10000** and **1:100000** with Dilution Buffer **DIL**.		
Before the assay procedure bring all reagents **to room temperature (20°C -25°C).**		

Assay procedure in double determination

Pipette	Reagents	Plate 1 AP	Plate 2 ELA	Plate 3 Exo A
100 µL	Negative Control **NC**	A1/A2	A1/A2	A1/A2
100 µL	Positive Control **PC1**	B1/B2	--	--
100 µL	Positive Control **PC2**	--	B1/B2	--
100 µL	Positive Control **PC3**	--	--	B1/B2
100 µL	Control **CTR**	C1/C2	C1/C2	C1/C2
100 µL	Sample Dilution **SPE**	Pipette in the rest of the wells according to requirements.		
Seal the wells of the 3 microtiter plates with the cover foil.				
Incubation: **2 h** at **37°C**				
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 3x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20/ well**			in each well
100 µL	Diluted **Antibody-HRP-Conjugate DET 1:100**			in each well
Seal the wells of the 3 microtiter plates with the cover foil.				
Incubation: **2 h** at **37°C**				
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 3x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20/ well**			in each well
100 µL	Substrate **S**			in each well
Incubation: **30 min** in the dark **at RT (20°C -25°C).**				
100 µL	Stop Solution **STP**			in each well
Measure the absorbance within **30 min** at **450 nm** with **≥ 590 nm** as reference wavelength.				

Exemplary version - not to be used for assay

9 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The Kit-control must be found within the acceptable range, which has been stated on the QC Certificate. The test results are only valid, if the test has been performed following the instructions. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws.

9.1 Quality criteria

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

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Calculation of results

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

10.2 Qualitative calculation:

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

The **cut-off value** is 20% of the absorbance of the Positive Control PC.

1: 1000 diluted samples with extinction values less than the cut off value are classified as **negative.** The antibody titre is below 1:500.

1: 1000 diluted samples, having an absorbance in the range of ≥ 20% but < 50% of positive control, cannot be clearly classified and must therefore be assessed as **borderline.**

1: 1000 diluted samples, which extinctions are ≥ 50% of PC extinction, are to be classified as **positive.**

Exemplary qualitative calculation:

Negative Control NC	Extinction
1.Value	0.041
2.Value	0.056
Mean	**0.049**

Positive Control PC	Extinction
1.Value	1.120
2.Value	1.136
Mean	**1.128**

Calculation

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

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

10.3 Quantitative calculation

The evaluation is carried out graphically or via an appropriate evaluation program.
The extinction values of the negative NC and positive PC controls are plotted on the y-axis in a double-linear coordinate system against a titer factor. NC = 0 and PC = 2.5 on the x-axis. For the quantification of the sera values, a straight line is drawn through the NC and PC values and extended to a titer factor of 3.5.
The titre of the individual serum is determined by reading the titre factor of the measured extinction value through the NC-PC axis, which is multiplied by the serum dilution factor.

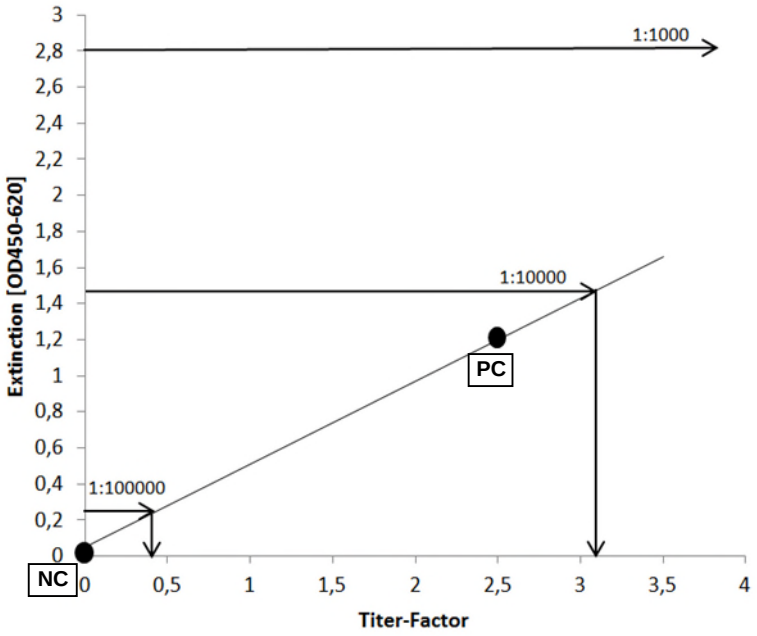
Titre factors lower than 0.25 and higher than 3.5 (x-axis) are not taken into consideration in these calculations.

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment !
Muster-Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

Exemplary quantitative calculation:

Negative Control NC	Extinction
1.Value	0.041
2.Value	0.056
Mean	**0.049**

Positive Control PC	Extinction
1.Value	1.220
2.Value	1.176
Mean	**1.198**



Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

Figure 1: Examplary graphic for the quantitative evaluation for serum B.

Sample	Dilution of Sample	Extinction (average)	Titre factor (see graphic)	Titre	Interpretation
Serum B	1:1000	2.82	> 3.5	n.a.	positive
	1:10000	1.45	3.05	1:(10000 x 3.05) => 1:30 500	positive
	1:100000	0.210	0.3	1:(100000 x 0.3) => 1:30000	positive

If an electronic analysis program is used, NC and PC have to be set as standards with the titer values of 0 and 2500. The program calculates the titer of the unknown sample. The dilution factor of the sample has to be taken into account.

Exemplary Version, do not use for assay accomplishment

10.4 Interpretation of results

This ELISA Kit is used as a complementary test to a classical microbiological detection of infection with Pseudomonas aeruginosa. If a sample is tested positive for antibodies against one of the three Pseudomonas aeruginosa exotoxins, this is a sign of corresponding infection. The evaluation of the measured antibody titres has to be done according to the scheme below. In the literature there are several studies describing the diagnostic performance of the assay (see table 5). These studies often do not differentiate between borderline and positive and apply only one cut-of value (1:500) to differentiate between negative and positive.

Titer	Interpretation
< 1:500	negative
1:500 to 1: 1250	borderline
> 1:1250	positive

For evaluation of the test results, the diagnostic sensitivity and specificity of the test system must be taken into account (see Section 12.7).

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. It is recommended to consider the international and national guidelines for diagnosis and treatment.

11 LIMITATION OF PROCEDURE

Basically, the result of immunological test systems can be affected by various sample components such as medications or lipids. Their influence is reduced by the assay design, but cannot be excluded completely. The evaluation of the results must be made in the context of diagnostic sensitivity and specificity of the assay (table 5). In acute and chronic P. aeruginosa infected patients suffering from immunosuppression, assessment of an infection via the detection of antibodies may be inadequate.

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity as a measure for the minimal amount of specific antibody detectable by this test system was determined by the signal variability of the negative control. Therefore, the recalculated antibody titre of the negative control was evaluated and the 3-fold standard deviation was used to determine the limit of detection. The results are shown in table 1.
The limit of detection of antibody titers for AP, ELA, Exo A in 1:1000 diluted samples is < 1:300.

Table 1 Analytical sensitivity / Limit of Detection based on 3-fold standard deviation of the blank. Shown is the recalculated antibody titre of three independent experiments.

Dilution	AP	ELA	Exo A
-	0.105	0.268	0.181
1:100	10	27	18
1:1000	105	268	181

12.2 Analytical Specificity

The analytical specificity was assessed by the evaluation of the microbiological status of serologically and microbiologically Pseudomonas-negative cystic fibrosis patients. Most frequently infections with *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Hemophilus influenza* were detected. These infections do not result in antibodies cross reacting with *Pseudomonas aeruginosa* antigens.

12.3 Precision

Intra-Assay Variance

Serum samples were diluted 1:1000 and measured 16-fold within one assay. The results are shown in table 2. Mean variance was 4.95, 4.49 and 8.41% for alkaline Protease, Elastase and Exotoxin A, respectively.

Table 2 Intra-Assay Variance

	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	AP	ELA	Exo A	AP	ELA	Exo A	AP	ELA	Exo A
Mean Titre	**806**	**529**	**715**	**3858**	**5521**	**5673**	**1453**	**1530**	**1381**
SD	35	43	91	173	135	127	88	44	142
VC [%]	4.3	8.14	12.71	4.47	2.45	2.25	6.08	2.86	10.29
Number[n]	16	16	16	16	14	16	16	16	16

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

Inter-Assay Variance

Samples were portioned and stored at -20°C for up to 12 years and measured irregularly during this time. Table 3 shows the summarized results for 3 different samples. The variability measured as coefficient of variation does not exceed 20% for any antigen or sample.

Table 3 Inter-Assay Variance

	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	AP	ELA	Exo A	AP	ELA	Exo A	AP	ELA	Exo A
Mean Titre	**1041**	**958**	**804**	**1743**	**1519**	**1239**	**2971**	**4071**	**4343**
SD	67	60	70	228	231	176	164	309	392
CV [%]	6.39	6.31	8.69	13.09	15.22	14.22	5.51	7.59	9.03
Number [n]	73	73	72	295	295	293	112	112	112

12.4 Linearity

Linearity of sample dilution was evaluated by dilution dependent signal decrease in three serum samples with high, medium and low antibody titres. In figure 2 the measured signals are shown in dependence of the sample dilution. Linear regression analysis revealed coefficients of correlation of >0.9 for all tested samples. The recalculated antibody titres show a good linearity, too.

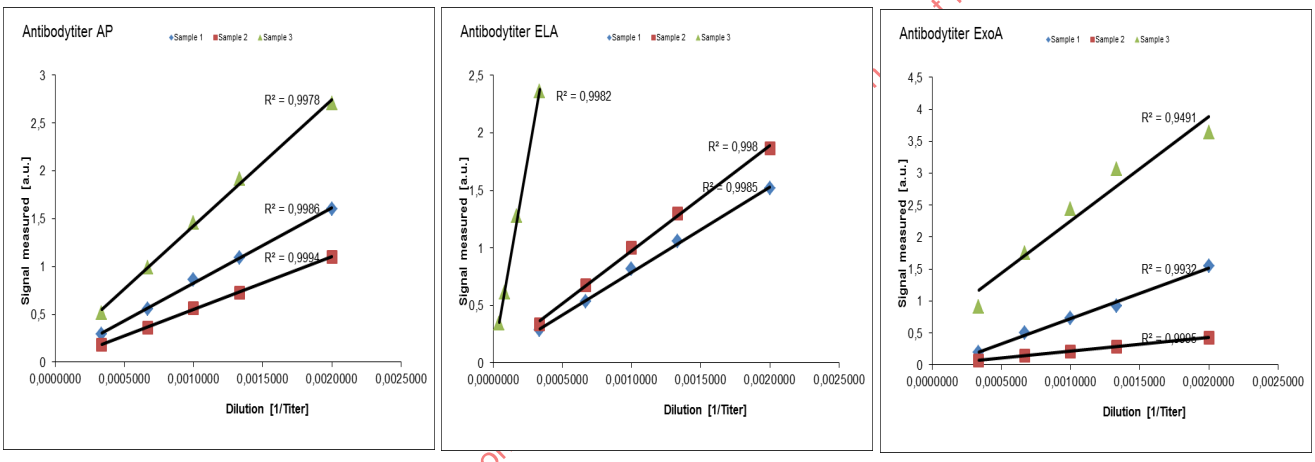


Figure 2 Linearity of sample dilution. Samples with high, medium and low antibody titre were diluted (1:500 – 1:24000) depending on the expected signal intensity and measured results were analysed by linear regression analysis.

12.5 Interference

Interference was not investigated, no information regarding the influence of triglycerides, hemoglobin or bilirubin is available. Therefore lipaemic, hemolytic or icteric samples should not be used for this assay.

12.6 Traceability / Assay Calibration

Neither an international standard preparation, purified human Anti-Pseudomonas aeruginosa antibodies nor an established reference method for measurement of these antibodies are available. Thus, the assay calibration is based on manufacturer positive controls with arbitrary antibody titres of 2500 (Mediagnost [1/Titre]). Selected human serum samples with defined antibody content are used for assay production and quality control. This panel allows the traceability of measurement results.

12.7 Diagnostic Quality

For evaluation of diagnostic sensitivity (true positive) and specificity (true negative) a comparison of E15 titre results in serum samples and the microbiological detection of Pseudomonas aeruginosa growth in throat swab samples by classical culture techniques has been conducted. For the evaluation of the test results regarding Pseudomonas aeruginosa infection only a distinction between positive and negative was made.

Exemplary version, do not use for assay acc
für Assayduchführung verwenden

Positive

At least one microbiological detection of Pseudomonas aeruginosa within 12 months before the serum sample was collected.

Negative

No microbiological detection of Pseudomonas aeruginosa within 12 months before the serum sample was collected

Table 4 Diagnostic Specificity and Sensitivity Here the absolute numbers of positive and negative results are shown in relation to the microbiological gold standard for different cut-off values (AP: alkaline Protease, ELA: Elastase; Exo A: Exotoxin A; Total: all three antigens). Based on the absolute numbers sensitivity (% true positive) and specificity (% true negative) are calculated).

Cut- off	1:100				1:500				1:1250			
	AP	ELA	Exo A	Total	AP	ELA	Exo A	Total	AP	ELA	Exo A	Total
True Positive **TP**	39	40	43	45	27	31	27	40	19	23	19	32
False Positive **FP**	10	8	11	12	2	2	3	5	1	0	0	1
True Negative **TN**	16	18	15	14	24	24	23	21	25	26	26	25
False Negative **FN**	12	11	8	6	24	20	24	11	32	28	32	19
Sensitivity [%] TP/(TP+FN)	76	78	84	88	53	61	53	78	37	45	37	63
Specificity [%] TN/(TN+FP)	62	69	58	54	92	92	88	81	96	100	100	96

A population of 77 cystic fibrosis patients was investigated, 51 patients were microbiologically positive for Pseudomonas aeruginosa before the serum sample was collected and 26 negative. These results conform to the data published by Kappler et al in 2006. Here the authors used a cut-off Titre of 500 and calculated an overall sensitivity of 86% and a specificity of 96%. In detail it was shown that sensitivity was 64; 53 and 73% for AP, ELA and Exo A, respectively. Specificity for AP, ELA and Exo A was calculated as 99; 100 and 96%. In comparison to our results Kappler et al. detected higher sensitivity and specificity values which probably are the consequence of an increased sample number (183 vs 77).

The Mediagnost test system has been evaluated by different independent research groups regarding its diagnostic sensitivity and specificity. In table 5 the results are summarized. Mean diagnostic specificity is 76% (48- 96) and mean diagnostic sensitivity is 84% (66–96).

Table 5 Summary of literature results describing diagnostic sensitivity and specificity in dependence of the applied cut-off titre value.

Autor	Journal	Jahr	Mediagnost Assay	Patient [n]	Cut-off Titre	Dignostic Sensitivity [%]	Dignostic Specificity [%]
Kappler et al.	Thorax	2006	AP/ ELA/ Exo A	183	500	86	96
Tramper-Stranders et al.	Thorax	2006	AP/ ELA/ Exo A	220 220	1250 500 AP > 0 ELA > 35 Exo A > 0	66 79 96	96 89 79
Ratjen et al.	Pediatric Pulmonol	2007	AP/ ELA/ Exo A	375	AP > 285 ELA > 300 Exo A > 1000	92.7	93.3
Dogru et al.	Turkish Journal of Pediatrics	2013	AP/ ELA/ Exo A	90	500	87.5	70
Anstead et al.	J Cystic Fibrosis	2013	AP/ ELA/ Exo A	304	100	78	48
Daines et al.	J Cystic Fibrosis	2014	AP/ ELA/ Exo A	68	100	66	56

13 LITERATUR / LITERATURE

Literature

1. West S, Zeng L, Lee L, Kosorok M, Laxova A, Rock M, Splaingard M, Farrell : Respiratory infections with Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis, early detection by serology and assessment of risk factors. JAMA, 2002, Vol 287, No.: 22: 2958-2967
2. Burns J, Gibson I, McNamara, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castille R, Smith A, Ramsey B: Longitudinal Assesment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. J Infect Dis 2001 ; 183 : 444-52
3. Döring G, Obernesser H-J, Botzenhart K: Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa. III Radioimmunoassay for detection of alkaline protease. Zentralbl Bakteriol Mikrob. Hyg (A) 1982; 252:239-47
4. Döring G., Obernesser H-J: Botzenhart K., Flehmig B: Høiby N., Hofmann A.: Proteases of Pseudomonas aerugionosa in cystic fibrosis. J Infect Dis 1983; 147:744-50
5. Döring G:, Høiby N: Longitudinal study of immune response to Pseudomonas aeruginosa antigens in cystic fibrosis. Infect Immun 1983; 42:197-201
6. Obernesser H-J, Döring G: Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa. IV. Radioimmunoassay for detection of elastase. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A) 1982; 252:248-56
7. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M: Serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Archives of Diseases in Childhood, 1986, 61, 1114-20
8. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M; Losowsky M S: Development of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies to Pseudomonas aerugionosa cell surface antigens in sera of patients with cystic fibrosis. J Clin Pathol 1986; 39: 1124-29
9. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M: Serum IgG antibodies in patient with cystic fibrosis with early Pseudomonas aeruginosa infection: Archives of Disease in Childhood, 1987, 62, 357-361
10. Brett M M, Ghoneim A T M, Littlewood J M: Prediction and Diagnosis of Early Pseudomonas aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis: a Follow-up Study: J of Clin Microb, Aug 1988 p 1565-70
11. Brett M M, Simmonds E J, Ghoneim A T M, Littlewood J M: The value of serum IgG titres against Pseudomonas aeruginosa in the management of early peudomonal infection in cystic fibrosis. Archives of Diseases in Childhood 1992; 67: 1086-1088
12. Danielsen L, Westh H, Balselv E, Rosdahl VT, Döring G: Pseudomonas aeruginosa exotoxin A antibodies in rapidly deteriorating chronic leg ulcers. The Lancet Jan 1996 Vol. 347 No.8996 p 265
13. Dasgupta MK; Lam J, Döring G, Harley FL, Zuberbuhler P, Lam K, Reichert A, Costerton JW, Dossetor JB: Prognostic implications of circulating immune complex and Pseudomonas aerugoinosa-specific antibodies in cystic fibrosis. J Clin Lab. Immunol. 1987, 23, 25-30
14. Döring G, Dalhoff A, Vogerl O, Brunner H, Dröge U, Botzenhard K. In vivo activity of Proteases of Pseudomonas aeruginosa in a rat model. The J of Infectious Diseases, Apri 1994, 4/Vol 149 p 532-537
15. Döring G, Buhl V, Høiby N, Schioth P O, Botzenhart K: Detection of Pseudomonas aeruginosa in immune complexes isolated from sputum of cystic fibrosis patients. Acta path microb. immunol. scand Sect. C, 92: 307-312, 1984
16. Döring G, Goldstein W, Röll A, Schiotz P O, Høiby N, Botzenhard K: Role of Pseudomonas aeruginosa Exoenzymes in Lung Infections of Patients with Cystic Fibrosis. Infection and Immunity, Sept 1985, p. 557-562
17. M Kappler 1 , A Kraxner , D Reinhardt , B Ganster , M Griese , T Lang: Diagnostic and Prognostic Value of Serum Antibodies Against Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis Thorax 61. 2006 Jan 31. 8, 684-688
18. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Slieker MG, Terheggen-Lagro SW, Teding van Berkhout F, Kimpen JL, Wolfs TF. Diagnostic value of serological tests against Pseudomonas aeruginosa in a large cystic fibrosis population. Thorax. 2006 Aug; 61,(8),:689-93.
19. Ratjen F1, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Döring G: Diagnostic value of serum antibodies in early Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol. 2007 Mar;42(3):249-55.
20. Doğru D., Pekcan S., Yalçın E. Özçelik U., Kiper N., Gürcan N., Şener B.: The role of serum Pseudomonas aeruginosa antibodies in the diagnosis and follow-up of cystic fibrosis. The Turkish Journal of Pediatrics 2013; 55: 50-57
21. Anstead M., Heltshe S., Khan U., Barbieri J., Langkamp M., Döring G., Dharia S., Gibson R., Treggiari M., Lymp J., Rosenfeld M., B. Pseudomonas aeruginosa serology and risk for re-isolation in the EPIC trial. Journal of Cystic Fibrosis 2013, 12 ,2 , 147 - 153
22. Daines C., VanDeVante D., Khan U., Emerson J., Heltshe S., McNamara S., Anstead M., Langkamp M., Döring G., Ratjen F., Ramsey B., Gibson R., Morgan W., Rosenfeld M.: Serology as a diagnostic tool for predicting initial Pseudomonas aeruginosa acquisition in children with cystic. Journal of Cystic Fibrosis 2014, 13 , 5 , 542 - 549

Exemplar / Version du mot Use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

14 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION

International Test Description

DET	**100x**	**1:100 DIL ➔ DET 1:100**		
WB	**20x**	**1:20 A. dest. ➔ WB 1:20**		
-	**SPE 1:1000 DIL** ↔			
-	**°C 20°C - 25°C** ⏲ **max. 1 h**			
		MTP AP	**MTP ELA**	**MTP Exo A**
100 µL	**NC**	A1/A2	A1/A2	A1/A2
100 µL	**PC1**	B1/B2	--	--
100 µL	**PC2**	--	B1/B2	--
100 µL	**PC3**	--	--	B1/B2
100 µL	**CTR**	C1/C2	C1/C2	C1/C2
100 µL	**SPE 1:1000 DIL**			
TAPE				
⏲ **2 h °C 37°C**				
3x 300 µL	**3x WB 1:20**			
100 µL	**DET 1:100**			
TAPE				
⏲ **2 h °C 37°C**				
3x 300 µL	**3x WB 1:20**			
100 µL	**S**			
⏲ **0.5 h °C 20°C – 25 °C** ✳				
STP				
MEASURE				

Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden
assay accomplis
sion-do not

15 ASSAY PROCEDURE

Preparation of Reagents		Dilution
DET	**Antibody-HRP-Conjugate Concentrate (100x)**	**1:100** in Dilution Buffer **DIL** ➔ **DET 1:100**
WB	**Washing Buffer Concentrate (20x)**	**in Aqua dest.** (z.B. 100 mL **WB** mit **A.dest** auf 2000 mL auffüllen) ➔ **WB 1:20**
Dilute samples **1:1000** with Dilution Buffer **DIL** (qualitative test). For quantitative antibody assays it is recommended to perform serial dilutions of **1:1000**, **1:10000** and **1:100000** with Dilution Buffer **DIL**.		
Before the assay procedure bring all reagents **to room temperature (20°C -25°C).**		

Assay procedure in double determination

Pipette	Reagents	Plate 1 AP	Plate 2 ELA	Plate 3 Exo A
100 µL	Negative Control **NC**	A1/A2	A1/A2	A1/A2
100 µL	Positive Control **PC1**	B1/B2	--	--
100 µL	Positive Control **PC2**	--	B1/B2	--
100 µL	Positive Control **PC3**	--	--	B1/B2
100 µL	Control **CTR**	C1/C2	C1/C2	C1/C2
100 µL	Sample Dilution **SPE**	Pipette in the rest of the wells according to requirements.		
Seal the wells of the 3 microtiter plates with the cover foils.				
Incubation: **2 h** at **37°C**				
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 3x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20**			in each well
100 µL	Diluted **Antibody-HRP-Conjugate DET 1:100**			in each well
Seal the wells of the 3 microtiter plates with the cover foils.				
Incubation: **2 h** at **37°C**				
3x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 3x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20/ well**			in each well
100 µL	Substrate **S**			in each well
Incubation: **30 min** in the dark **at RT (20°C -25°C).**				
100 µL	Stop Solution **STP**			in each well
Measure the absorbance within **30 min** at **450 nm** with **≥ 590 nm** as reference wavelength.				

Exemplary Version - not to be used for assay procedure - not compliant with IVDR / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

This assay procedure is a duplicate of the page 24.