



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

**NovaLisa®**

# TBE/FSME IgM

**ELISA**

**CE**

**Only for in-vitro diagnostic use**

|  |    |
|--|----|
| English .....  | 2  |
| Deutsch .....  | 7  |
| Français .....   | 13 |
| Italiano .....   | 18 |
| Español .....  | 23 |
| Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia .....  | 30 |
| Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas .....  | 30 |
| Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos .....   | 31 |
| Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procédure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste ..... | 32 |

---

Product Number:      TICM0440 (96 Determinations)

---

## ENGLISH

### 1. INTRODUCTION

---

Tick-borne encephalitis (TBE) virus is a flavivirus of the family *Togaviridae*. It is an enveloped single-stranded RNA virus with cubic icosahedral symmetry and ranges in size from 20-80nm in diameter.

Three subtypes can be distinguished which show only little differences in their structural proteins.

TBE virus is mainly transmitted by ticks. The degree of contamination of ticks (and thus humans) in central Europe increases from west to east, and anybody may be affected. Specific antibody development yields a life-long immunity.

TBE is the most important tick-transmitted disease of man -beside Lyme disease, which is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi*. The clinical course of the disease depends on the immune status of the infected persons. A high virus production in the primary infected tissues is required for the passage of the blood-brain barrier and the resulting severe manifestations in the central nervous system.

| Species        | Disease  | Symptoms (e.g.)  | Transmission route  |
|----------------|--|--|---|
| TBE/FSME Virus | Tick-borne encephalitis<br><br>CEE (Central European Encephalitis) | Phase 1: unspecific flu-like symptoms (mild fever, headache, muscle pain, joint pain, gastrointestinal complaints)<br><br>Phase 2: high fever, development of meningitis and / or encephalitis | By tick bites ( <i>Ixodes ricinus</i> , western subtype; <i>Ixodes persulcatus</i> , eastern subtype);<br>Rarely by infected (non-pasteurized) milk |

The presence of virus resp. infection may be identified by:

- Serology: e.g. ELISA, Neutralization, Hemagglutination Inhibition, Complement Fixation

### 2. INTENDED USE

---

The TBE/FSME Virus IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against TBE/FSME Virus in human serum or plasma (citrate, heparin).

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

---

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

### 4. MATERIALS

---

#### 4.1. Reagents supplied

- **TBE/FSME Coated Microplate (IgM):** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with TBE/FSME Virus antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent:** 1 bottle containing 100 ml of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; anti-human IgG (RF Absorbent); coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **TBE/FSME anti-IgM Conjugate:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled antibody to human IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap; < 5% NMP.
- **TBE/FSME IgM Positive Control:** 1 vial containing 2 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; red cap.
- **TBE/FSME IgM Cut-off Control:** 1 vial containing 3 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; green cap.
- **TBE/FSME IgM Negative Control:** 1 vial containing 2 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; blue cap.

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

## 4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

### 6.1. Coated Microplate

The break-apart snap-off strips are coated with TBE/FSME Virus antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

### 6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 ml Washing Buffer + 190 ml distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37°C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

### 6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

## 7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

---

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. For CSF please use the instruction for use ABVL0001. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing.

Heat inactivation of samples is not recommended.

### 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three to five and the volume of Washing Buffer from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to  $37 \pm 1$  °C.

1. Dispense 100 µl standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour  $\pm$  5 min at  $37 \pm 1$  °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µl Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

### 8.2. Measurement

Adjust the ELISA microwell plate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microwell plate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

**Measure the absorbance** of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

### 9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43  
Cut-off = 0.43

#### 9.2.1. Results in Units [NTU]

$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = \text{[NovaTec Units = NTU]}$

Example:  $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU (Units)}$

### 9.3. Interpretation of Results

|           |            |   |
|-----------|------------|---|
| Cut-off   | 10 NTU     | -   |
| Positive  | > 11 NTU   | Antibodies against the pathogen are present.<br>There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).<br><u>After vaccination:</u><br>This is a case of seroconversion.<br>Check anamnestic data and if necessary complete basic immunization or give a booster   |
| Equivocal | 9 – 11 NTU | Antibodies against the pathogen could not be detected clearly.<br>It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as <b>negative</b> .<br><u>After vaccination:</u><br>This may be a case of seroconversion.<br>Continue with basic immunisation or booster.<br>Repeat test within 2-4 weeks.<br>A non-specific reaction is not excluded. |
| Negative  | < 9 NTU    | The sample contains no antibodies against the pathogen.<br>A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.<br><u>After vaccination:</u><br>No seroconversion after vaccination.<br>This may be the case after the first vaccination during basic immunisation.<br>Patients which show low or no response.   |

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.  
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

#### 9.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

| Serology | Significance  |
|----------|---|
| IgM      | Characteristic of the primary antibody response<br>High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection<br>Rare: → persisting IgM |
| IgG      | Characteristic of the secondary antibody response<br>May persist for several years<br>High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection      |

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

### 10.1. Precision

| Intraassay | n  | Mean (E)   | CV (%) |
|------------|----|------------|--------|
| #1         | 24 | 0.490      | 8.77   |
| #2         | 24 | 1.039      | 7.77   |
| #3         | 24 | 0.917      | 11.74  |
| Interassay | n  | Mean (NTU) | CV (%) |
| #1         | 12 | 18.14      | 10.86  |
| #2         | 12 | 15.99      | 13.26  |
| #3         | 12 | 2.04       | 12.56  |

### 10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.  
It is 98.29% (95% confidence interval: 95.07% - 99.65%).

### 10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.  
It is 100.0% (95% confidence interval: 69.15% - 100.0%).

#### 10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.5 mg/ml bilirubin.

#### 10.5. Cross Reactivity

Cross reactivity with other flaviviruses cannot be excluded and should be taken into account for result interpretation.

### 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

### 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

#### 12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

### 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.: TICM0440 TBE/FSME IgM ELISA (96 Determinations)

# DEUTSCH

## 1. EINLEITUNG

Das die Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) verursachende Virus gehört zum Genus Flavivirus in der Familie der Flaviviridae. Es handelt sich um ein umhülltes Einzelstrang RNA Virus von dem 3 Typen unterschieden werden können, die lediglich geringfügige Unterschiede im Aufbau ihrer Strukturproteine aufweisen. Zwischen den europäischen und fernöstlichen Subtypen bestehen große Antigengemeinschaften. Die Übertragung erfolgt durch Zeckenstich, sehr selten durch virusinfizierte Milch von Ziegen und Schafen, in Ausnahmefällen auch von Kühen. Eine Infektion von Mensch zu Mensch gibt es nicht. Das primäre Erregerreservoir sind Kleinsäugerpopulationen, insbesondere Mäuse, aber auch Vögel, Rehe und Rotwild. FSME-Virus übertragende Zecken kommen in vielen europäischen Ländern und in Asien vor.

Die Krankheit tritt in Abhängigkeit von der Aktivität der virustragenden Zecken bevorzugt im Frühjahr und im frühen Sommer auf, in manchen Jahren wird auch ein Herbstgipfel beobachtet. Bei warmer Witterung kann sie auch in anderen Jahreszeiten vorkommen.

Der Krankheitsverlauf ist biphasisch. Es kommt zunächst zu grippeähnlichen Symptomen mit mäßigem Fieber (in der Regel nicht über 38°C), Kopfschmerzen, Erbrechen, Schwindelgefühl. Nach einem fieberfreien Intervall von etwa einer Woche (bis zu 20 Tagen) entsteht bei etwa 10 % dieser Patienten eine Meningoenzephalitis mit Fieber, Erbrechen, meningealen Reizerscheinungen, vereinzelt Auftreten von Stupor oder Koma. Vor allem bei älteren Patienten kann sich zusätzlich eine Myelitis entwickeln. In diesen Fällen besteht die Gefahr von bleibenden neurologischen Ausfällen, in der Regel in Form von Paresen, aber auch von Anfallsleiden oder lange andauernden Kopfschmerzen. Diese Symptome können oft Monate nach der Erkrankung persistieren. Häufig kommt es jedoch selbst nach schweren Verläufen zur völligen Heilung. Bei 1-2 % der Erkrankten mit ZNS-Beteiligung führt die Erkrankung zum Tode. Schwere Krankheitsverläufe werden fast nur bei Erwachsenen beobachtet.

Die aktive Immunisierung stellt einen wirksamen Schutz für potenziell gefährdete Einwohner und Besucher von Risikogebieten dar.

Eine postexpositionelle Immunglobulinprophylaxe erreicht gegenüber der aktiven Immunisierung eine deutlich geringere Schutzrate, die mit etwa 60 % angegeben wird.

| Spezies        | Erkrankung  | Symptome (z.B.)  | Infektionsweg   |
|----------------|---|--|---|
| TBE/FSME Virus | Frühsommer-Meningoenzephalitis<br><br>CEE (Central European Encephalitis) | Phase 1: Unspezifische grippeartige Symptome (leichtes Fieber, Kopf-, Muskel-, Gliederschmerzen, gastrointestinale Beschwerden)<br><br>Phase 2: hohes Fieber, Entwicklung einer Meningitis und/oder Enzephalitis | Stiche von infizierten Zecken (Ixodes ricinus, western subtype; Ixodes persulcatus, eastern subtype)<br><br>selten durch infizierte Milch (nicht pasteurisiert) |

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Serologie: z.B. ELISA, Neutralisationstest, Hämagglutinations-Hemmtest, Komplementbindungsreaktion

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der TBE/FSME IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen TBE/FSME in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.



## 4. MATERIALIEN

---

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **TBE/FSME beschichtete Mikrotiterplatte (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit TBE/FSME Virus Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; anti-human IgG (RF- Absorbens); grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0,2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **TBE/FSME anti-IgM Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM in Phosphatpuffer (10 mM); rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; < 5% NMP.
- **TBE/FSME IgM Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **TBE/FSME IgM Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **TBE/FSME IgM Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

### 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

### 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37°C
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipetten (10 - 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

## 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

### 6.1. Beschichtete Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit TBE/FSME Virus Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

### 6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 ml Waschpuffer + 190 ml destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

### 6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Für Liquor ist die Arbeitsanleitung ABVL0001 zu verwenden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

## 7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z. B. 10 µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf  $37 \pm 1$  °C einstellen.

1. Je 100 µl Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.  
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

### 8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200 und < Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

### 9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86: 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

#### 9.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

### 9.3. Interpretation der Ergebnisse

| Cut-off     | 10 NTU     | -  |
|-------------|------------|--|
| Positiv     | >11 NTU    | Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.<br><u>Nach Impfungen</u><br>Serokonversion nach Impfung<br>Impfdaten prüfen, wenn nötig Grundimmunisierung vervollständigen bzw. Auffrischen.  |
| Grenzwertig | 9 – 11 NTU | Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als <b>negativ</b> .<br><u>Nach Impfungen</u><br>möglich Serokonversion nach Impfung<br>mit der Grundimmunisierung fortfahren bzw. Auffrischen unspezifische Reaktionen sind nicht ausgeschlossen |
| Negativ     | < 9 NTU    | Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.<br>keine Serokonversion nach Impfung<br><u>Nach Impfungen</u><br>keine Serokonversion nach Impfung<br>möglich nach der ersten Teilimpfung bei Grundimmunisierung<br>Patienten mit langsamer oder fehlender Impfantwort   |

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

### 9.3.1. Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

| Serologie | Bedeutung  |
|-----------|--|
| IgM       | Typisch für Primärantwort<br>Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion<br>Selten: → persistierendes IgM                            |
| IgG       | Typisch für Sekundärantwort<br>Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein<br>Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion |

## 10. TESTMERKMALE

---

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte NovaTec Immundiagnostica GmbH.

### 10.1. Präzision

| <b>Intraassay</b> | <b>n</b> | <b>Mittelwert (E)</b>   | <b>Vk (%)</b> |
|-------------------|----------|-------------------------|---------------|
| #1                | 24       | 0,490                   | 8,77          |
| #2                | 24       | 1,039                   | 7,77          |
| #3                | 24       | 0,917                   | 11,74         |
| <b>Interassay</b> | <b>n</b> | <b>Mittelwert (NTU)</b> | <b>Vk (%)</b> |
| #1                | 12       | 18,14                   | 10,86         |
| #2                | 12       | 15,99                   | 13,26         |
| #3                | 12       | 2,04                    | 12,56         |

### 10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 98,29% (95% Konfidenzintervall: 95,07% - 99,65%).

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 100,0% (95% Konfidenzintervall: 69,15% - 100,0%).

### 10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,5 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

### 10.5. Kreuzreaktivität

Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren können nicht ausgeschlossen werden und sollten bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

---

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

---

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

### 12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

## 13. BESTELLINFORMATIONEN

---

Produktnummer:      TICM0440                      TBE/FSME IgM ELISA (96 Bestimmungen)

# FRANÇAIS

## 1. INTRODUCTION

---

Le virus de l'encéphalite à tiques est un flavivirus de la famille Togaviridae. C'est un virus ARN monocaténaire enveloppé avec une symétrie icosaédrique et cubique de 20-80nm de diamètre.

Il n'y a que trois sous-types antigéniques existents. Ceux-ci montrent seulement des petites différences en leurs protéines structurales.

Le virus de l'encéphalite à tiques est principalement transmis par des coutils. Le pourcentage de tiques contaminées (et ainsi le nombre des humains infectés) en Europe centrale augmente de l'Ouest à l'Est, et tout le monde peut être affecté. Le développement d'anticorps spécifiques rapporte une immunité qui dure toute la vie.

Le virus de l'encéphalite à tiques est la maladie la plus importante transmise par des tiques, à part de la maladie de Lyme, qui est causée par *Borellia burgdorferi*. Le développement clinique de la maladie dépend du statut immunitaire des personnes infectées. Une production élevée de virus dans les tissus infectés en premier est exigée pour le passage par la barrière hémato-méningée, qui produit des manifestations graves dans le système nerveux central.

| Espèce                          | La maladie  | Symptômes (p.ex.)   | Modes de transmission  |
|---------------------------------|---|---|--|
| virus de l'encéphalite à tiques | Encéphalite à tiques<br>- encéphalite d'Europe centrale | Phase 1: symptômes non spécifiques de la grippe (fièvre légère, maux de tête, douleurs musculaires, douleurs articulaires, troubles gastro-intestinaux)<br><br>Phase 2: fièvre élevée, développement de méningite et / ou d'encéphalite | Transmission principalement par des morsures de tiques ( <i>Ixodes ricinus</i> , western subtype; <i>Ixodes persulcatus</i> , eastern subtype);<br>Rarement par l'ingestion de lait infecté (non pasteurisé) |

L'identification de l'agent pathogène ou d'une infection par:

- Sérologie : p. ex. ELISA, neutralisation, Inhibition d'hémagglutination, test de fixation du complément

## 2. INDICATION D'UTILISATION

---

La trousse TBE/FSME IgM ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps IgM anti-TBE/FSME virus dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

## 3. PRINCIPE DU TEST

---

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques est basée sur la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Microplaques sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

## 4. MATERIEL

---

### 4.1. Réactifs fournis

- **TBE/FSME IgM microplaque revêtus:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène de TBE/FSME; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant pour échantillon IgM:** 1 flacon contenant 100 ml de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; anti-humaine IgG (RF-Absorbant); prêt à l'emploi; couleur vert; bouchon blanc.
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0,2 mol/l; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH  $7,2 \pm 0,2$ ) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué TBE/FSME anti-IgM:** 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps IgM anti-humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur rouge, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune; < 5% NMP.
- **Contrôle positif TBE/FSME IgM:** 1 flacon contenant 2 ml contrôle (sérum humain ou plasma); prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge.
- **Contrôle Cut-off TBE/FSME IgM:** 1 flacon contenant 3 ml contrôle (sérum humain ou plasma); prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert.
- **Contrôle négatif TBE/FSME IgM:** 1 flacon contenant 2 ml contrôle (sérum humain ou plasma); prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu.

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

### 4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

### 4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

## 5. STABILITE ET CONSERVATION

---

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8°C.

## 6. PREPARATION DES REACTIFS

---

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

### 6.1. Microplaque revêtues

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de TBE/FSME. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrette restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

### 6.2. Tampon de lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de lavage 1+19; par exemple 10 ml du Tampon de lavage + 190 ml d'eau distillée. L'échantillon de tampon diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

### 6.3. Solution de substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

## 7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

---

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Les instructions d'utilisation ABVL0001 doit être utilisé pour le LCS. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

## 7.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec diluant de l'échantillon IgM: Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml I diluant de l'échantillon IgM dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

## 8. PROCEDE DE TEST

---

### 8.1. Préparation du test

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de lavage de 300 à 350 µl. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à  $37 \pm 1$  °C.

1. Pipeter 100 µl de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à  $37 \pm 1$  °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de Tampon du lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape.  
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats !
5. Pipeter 100 µl du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante ( $20...25^{\circ}\text{C}$ ).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante ( $20...25^{\circ}\text{C}$ ) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

### 8.2. Mesure

Réglez le lecteur de microplaques ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur de microplaques ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

**Mesurer l'absorbance** de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

## 9. RESULTATS

---

### 9.1. Critères de validation

Afin de valider le test, les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance < **0,100**
- **Contrôle négatif:** Valeur d'absorbance < **0,200** et < **Cut-off**
- **Contrôle Cut-off:** Valeur d'absorbance **0,150 – 1,300**
- **Contrôle positif:** Valeur d'absorbance > **Contrôle Cut-off**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

### 9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du Contrôle Cut-off.

Exemple:  $0,44 \text{ DO Contrôle Cut-off} + 0,42 \text{ DO Contrôle Cut-off} = 0,86: 2 = 0,43$   
Cut-off = 0,43



### 9.2.1. Résultats en unités [NTU]

Valeur (moyenne) d'absorbance de l'échantillon x 10 = [unités NovaTec = NTU]  
Cut-off

Exemple:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

### 9.3. Interprétation des résultats

|            |            |  |
|------------|------------|--|
| Cut-off    | 10 NTU     | -  |
| Positif    | > 11 NTU   | Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il ya eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).<br><u>Après la vaccination</u><br>ceci est un cas de séroconversion.<br>vérifier les données anamnestiques et accomplir l'immunisation de base au besoin, ou administrer un booster.   |
| Zone grise | 9 – 11 NTU | Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore dans la zone grise l'échantillon est jugé <b>négatif</b> .<br><u>Après la vaccination</u><br>peut être un cas de xéroconversion<br>continuer l'immunisation de base ou booster<br>répéter le test dans un délai de 2-4 semaines<br>une réaction non spécifiques n'est pas exclue |
| Négatif    | < 9 NTU    | L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable.<br><u>Après la vaccination</u><br>aucune séroconversion après la vaccination<br>peut se produire après la première vaccination pendant l'immunisation de base.<br>patients qui ne montrent une réponse basse ou aucune réponse   |

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

#### 9.3.1. Isotypes d'anticorps et l'Etat de l'infection

| Sérologie | Signification   |
|-----------|---|
| IgM       | Caractéristique de la réponse primaire du anticorps<br>Titre élevé d'IgM avec une faible titre d'IgG: → suggère une infection très récente ou aiguë<br>Rare: → persistante IgM              |
| IgG       | Caractéristique de la réponse secondaire du anticorps<br>Peut persister pendant plusieurs années<br>Des titres élevés d'IgG à faible titre d'IgM: → peuvent indiquer une infection ancienne |

## 10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties. Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

### 10.1. Précision

| Intra-essai | n  | moyenne (E)   | CV (%) |
|-------------|----|---------------|--------|
| #1          | 24 | 0,490         | 8,77   |
| #2          | 24 | 1,039         | 7,77   |
| #3          | 24 | 0,917         | 11,74  |
| Inter-essai | n  | moyenne (NTU) | CV (%) |
| #1          | 12 | 18,14         | 10,86  |
| #2          | 12 | 15,99         | 13,26  |
| #3          | 12 | 2,04          | 12,56  |

### 10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 98,29% (95% Intervalle de confiance: 95,07% - 99,65%).

### 10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 100,0% (95% Intervalle de confiance: 69,15% - 100,0%).

### 10.4. Interférences

Des échantillons hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,5 mg/ml de bilirubine.

### 10.5. Réaction croisée

La réactivité croisée avec d'autres flavivirus ne peut être exclue et doit prendre en compte pour l'interprétation des résultats.

## 11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

---

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

## 12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

---

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le ELISA est uniquement destinée à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

### 12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

## 13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

---

Référence:                    TICM0440                    TBE/FSME IgM ELISA (96 déterminations)

## ITALIANO

### 1. INTRODUZIONE

Il Virus dell'encefalite da zecca dell'Europa centrale fa parte del gruppo dei Flaviviridae. Si tratta di un virus con involucro contenente RNA a singolo filamento. È possibile distinguere tre tipi diversi. Gli antigeni dei tipi europei e orientali sono comuni. La trasmissione avviene attraverso il morso di zecche oppure raramente attraverso latte infetto di pecore e capre. Non esiste una trasmissione diretta tra essere umani. Il serbatoio biologico sono soprattutto topi ma anche uccelli, e cervi. Le zecche che trasmettono il virus si trovano in molti paesi europei e asiatici. Il numero delle persone infette aumenta in primavera e all'inizio dell'estate. La manifestazione della malattia si divide in due fasi. I primi sintomi sono febbre, in genere non più alta di 38°C, cefalea, vomito e vertigini. Dopo un intervallo senza febbre di circa una settimana (può durare anche fino a 20 giorni) tornano i sintomi febbre, vomito, stupore ed anche coma. I pazienti anziani spesso dimostrano anche i sintomi di una mielite. In questi casi possono aversi paralisi degli arti e dei muscoli del collo e del dorso. È possibile prevenire l'insorgere della malattia, che spesso ha esito mortale (1-2%), con il ricorso a vaccinazioni.

| Specie    | Malattia  | Sintomi (p.es.)   | Via di trasmissione   |
|-----------|---|---|---|
| TBE VIRUS | Encefalite trasmessa da zecche<br>- Encefalite centroeuropea, CEE | Fase 1: sintomi non specifici simil-influenzali (lieve febbre, mal di testa, dolori muscolari, dolori articolari, disturbi gastrointestinali)<br><br>Fase 2: febbre alta, lo sviluppo di meningite e / o encefalite | Morso di zecche (Ixodes ricinus, western subtype; Ixodes persulcatus, eastern subtype);<br>Raramente da infetto latte (non pastorizzato). |

La presenza di agenti patogeni o infezione può essere identificato mediante:

- Sierologia: p. es. ELISA, test di neutralizzazione, Inibizione dell'emoagglutinazione, fissazione del complemento

### 2. USO PREVISTO

Il TBE/FSME IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM del TBE/FSME virus nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

### 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Micropiastre sono rivestiti con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un lettore di micropiastre ELISA.

### 4. MATERIALI

#### 4.1. Reagenti forniti

- TBE/FSME (IgM) micropiastre rivestita:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della TBE/FSME Virus; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- Tampone diluente IgM:** 1 fialone contenente 100 ml di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; anti-umane IgG (mezzo di assorbimento RF); colore verde; pronto all'uso; tappo bianco.
- Soluzione bloccante:** 1 fialone contenente 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 fialone contenente 50 ml di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco.
- Coniugato TBE/FSME anti-IgM:** 1 fialone contenente 20 ml di anticorpi IgM anti-umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- Soluzione Substrato TMB:** 1 fialone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo; < 5% NMP.
- Controllo positivo TBE/FSME IgM:** 1 fialone da 2 ml controllo (siero o plasma umano); colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- Controllo cut-off TBE/FSME IgM:** 1 fialone da 3 ml controllo (siero o plasma umano); colore giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- Controllo negativo TBE/FSME IgM:** 1 fialone da 2 ml controllo (siero o plasma umano); colore giallo; tappo blu; pronto all'uso.

Per le sostanze potenziali pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

## 4.2. Accessori forniti

- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

## 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37°C
- Lavatore, manuale o automatico, di micropiastre
- Micropipette per l'uso tra 10-1000 µl
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

## 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C.

## 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20...25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

### 6.1. Micropiastre rivestita

Le strisce divisibili sono rivestite con gli antigeni della TBE/FSME Virus. Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

### 6.2. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone di lavaggio 1+19; per esempio: 10 ml del Tampone di lavaggio + 190 ml di acqua distillata. Il campione di tampone diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

### 6.3. Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Per il CSF, si prega di utilizzare le istruzioni per l'uso ABVL0001. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70...-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento. L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

### 7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone IgM e mescolare bene (Vortex).

## 8. PROCEDIMENTO

---

### 8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eeguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a  $37 \pm 1$  °C.

1. Pipettare 100 µl di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37 \pm 1$  °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.  
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
5. Pipettare 100 µl di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente (20...25 °C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20...25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µl di Soluzione bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo avviene.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione bloccante.

### 8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

## 9. RISULTATI

---

### 9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < **0,100**
- **Controllo negativo:** Valore di assorbanza < **0,200 e < Cut-off**
- **Controllo cut-off:** Valore di assorbanza **0,150 – 1,300**
- **Controllo positivo:** Valore di assorbanza > **Cut-off**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

## 9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo cut-off 0,42 = 0,86/2 = 0,43  
Cut-off = 0,43

### 9.2.1. Risultati in unità [NTU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$

Esempio:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

## 9.3. Interpretazione dei risultati

| Cut-off     | 10 NTU     | -  |
|-------------|------------|--|
| Positivo    | > 11 NTU   | Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).<br><u>Dopo la vaccinazione</u><br>siero conversione dopo vaccinazione<br>Controllare i dati risultanti dalla vaccinazione, ripetere la vaccinazione di base se necessario.  |
| Zona grigia | 9 – 11 NTU | Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente.<br>Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane.<br>Se il risultato è nuovamente nella zona grigia, il campione viene giudicato come <b>negativo</b> .<br><u>Dopo la vaccinazione</u><br>possibile siero conversione dopo vaccinazione<br>Continuare con la vaccinazione di base oppure ripetere<br>Reazioni a specifiche non possono escludersi |
| Negativo    | < 9 NTU    | Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.<br>nessuna siero conversione dopo vaccinazione<br><u>Dopo la vaccinazione</u><br>Possibile dopo il primo richiamo della vaccinazione di base<br>Pazienti con una risposta immunitaria lenta oppure assente  |

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test.

È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.

I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

### 9.3.1. Isotipi degli anticorpi e Stato dell'infezione

| Sierologia | Significato  |
|------------|--|
| IgM        | Caratteristica della risposta primaria dell'anticorpo<br>Alto titolo IgM con basso titolo IgG: → suggerisce una infezione molto recente o acuta<br>Raro: → IgM persistente |
| IgG        | Caratteristica della risposta secondaria dell'anticorpo<br>Può persistere per diversi anni<br>Alto titolo IgG con basso titolo IgM: → può indicare un'infezione passata    |

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare NovaTec Immundiagnostica GmbH.

### 10.1. Precisione

| Intradossaggio | n  | Media (E)   | CV (%) |
|----------------|----|-------------|--------|
| #1             | 24 | 0,490       | 8,77   |
| #2             | 24 | 1,039       | 7,77   |
| #3             | 24 | 0,917       | 11,74  |
| Interdossaggio | n  | Media (NTU) | CV (%) |
| #1             | 12 | 18,14       | 10,86  |
| #2             | 12 | 15,99       | 13,26  |
| #3             | 12 | 2,04        | 12,56  |

## 10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analiti specifici.  
La specificità diagnostica è 98,29% (95% intervallo di confidenza: 95,07% - 99,65%).

## 10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analiti specifici.  
La sensibilità diagnostica è 100,0% (95% intervallo di confidenza: 69,15% - 100,0%).

## 10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/ml di emoglobina, 5 mg/ml di trigliceridi e 0,5 mg/ml di bilirubina non hanno presentato fenomeni d'interferenza nel presente test.

## 10.5. Reattività crociata

Reattività crociata con altri flavivirus non può essere esclusa e deve essere preso in considerazione quando s'interpretano i risultati.

## 11. LIMITAZIONI

---

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze.

## 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

---

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione incrociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

### 12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

## 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

---

Numero del prodotto:           TICM0440           TBE/FSME IgM ELISA (96 determinazioni)

# ESPAÑOL

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus que causa la encefalitis centroeuropea pertenece al género de los Flavivirus de la familia de los Flaviviridae. Se trata de un virus de A.R.N. de cadena simple con envolutra y se distinguen tres tipos diferentes. Entre los tipos europeos y los subtipos orientales existen grandes similitudes en los antígenos. La transmisión es por la picadura de la garrapata, muy pocas veces por leche infectada de cabras u ovejas, en casos excepcionales de vacas. No existe una transmisión entre humanos. El depósito del germen patógeno son mamíferos pequeños, sobre todo ratones, pero también aves, corzos y venado. Las garrapatas que transmiten el virus viven en muchos países europeos y asiáticos. La enfermedad se manifiesta dependiendo de la actividad de la garrapata sobre todo en la primavera y principios del verano, en algunos años se detecta también una cima en otoño. El curso es bifásico. Al principio la enfermedad produce síntomas parecidos a la gripe con fiebre leve, dolores de cabeza, vómitos, náuseas. Pasado una temporada libre de fiebre (7 a 20 días) se produce una meningoencefalitis en aprox. el 10% de los pacientes con fiebre, vómitos, irritaciones meníngeas, a veces estupor o coma. Sobre todo en ancianos se desarrolla de momento una mielitis. Estos casos incluyen el riesgo de fallos neurológicos persistentes, por regla general en forma de parestias, pero también sufriendo de ataques o de dolores de cabeza persistentes. Los síntomas persisten muchas veces años después de la infección. Muchos casos graves sin embargo llegan a la curación completa. El 1 al 2% de los casos en los que el sistema nervioso central está afectado son letales. Los cursos malignos de la enfermedad casi solamente se ven en adultos.

La inmunización activa es una protección eficaz para habitantes y visitantes de áreas de alto riesgo de contagio. En comparación con la protección de la inmunización post-infecciosa esta tiene mucho menor eficacia (aprox. 60%).

| Especies                                       | Enfermedad   | Síntomas (p.ej.)   | Vía de transmisión  |
|--|--|--|---|
| Virus de la encefalitis por garrapatas (TBEV), | Encefalitis transmitida por garrapatas (meningoencefalitis de garrapata (TBE)) | Fase 1: síntomas inespecíficos similares a la gripe (fiebre leve, dolor de cabeza, dolor muscular, dolor en las articulaciones, dolencias gastrointestinales)<br><br>Fase 2: fiebre alta, desarrollo de meningitis y / o encefalitis | Picadura de la garrapata (europa del oeste: Ixodes ricinus; europa del este: Ixodes persulcatus);<br>En raras ocasiones por la leche infectada (no pasteurizada). |

La bacteria puede ser detectada por:

- Serología: p.ej. ELISA, neutralización, inhibición de hemaglutinación, Fijación del Complemento

## 2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático TBE/FSME IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra TBE/FSME en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las microplacas están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un lector de microplacas ELISA.



## 4. MATERIALES

---

### 4.1. Reactivos suministrados

- **TBE/FSME IgM microplaca recubierta:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de TBE/FSME, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgM de la muestra:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; anti-humana IgG (RF Absorbente); color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0,2 mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 ml de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; tapa blanca.
- **Conjugado TBE/FSME anti-IgM:** 1 botella de 20 ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla; < 5% NMP.
- **Control positivo TBE/FSME IgM:** 1 botella de 2 ml control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off TBE/FSME IgM:** 1 botella de 3 ml control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado.
- **Control negativo TBE/FSME IgM:** 1 botella de 2 ml control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

### 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

### 4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de microplaca con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas para uso de (10-1000  $\mu$ l)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

## 5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

---

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

## 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

---

Es muy importante llevar Todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

### 6.1. Microplaca recubierta

As tiras rompibles están recubiertas con antígenos de TBE/FSME. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

### 6.2. Tampón de lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de lavado 1+19; por ejemplo: 10 ml de la Tampón de lavado + 190 ml de agua destilada. La muestra de tampón diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

### 6.3. Solución de sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

## 7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

---

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Las instrucciones de uso ABVL0001 deben ser usadas para LCR. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

## 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, por ejemplo 10 µl de la muestra con 1 ml de tampón IgM, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. PROCEDIMIENTO

---

### 8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de Tampón de lavado de 300 µl a 350 µl para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

1. Pipetear 100 µl de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h  $\pm$  5 min a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la Tampón de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.  
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µl de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ( $20...25^\circ\text{C}$ ).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetar 100 µl de la Solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ( $20...25^\circ\text{C}$ ).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

### 8.2. Medición

Ajustar el lector de microplaca (fotómetro) Elisa **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el lector de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

## 9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

---

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < **0,100**
- **Control negativo:** valor de la extinción < **0,200** y < **Cut-off**
- **Control cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

### 9.2. Calculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de lo Control cut-off.

Ejemplo:  $0,42 \text{ OD Control cut-off} + 0,44 \text{ OD Control cut-off} = 0,86:2 = 0,43$   
Cut-off = 0,43

### 9.2.1. Resultados en unidades [NTU]

Promedio valor de la extinción de la muestra x 10 / Cut-off = [NovaTec-unidades = NTU]

Ejemplo:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

### 9.3. Interpretación de los resultados

|                 |            |  |
|-----------------|------------|--|
| Cut-off         | 10 NTU     | -  |
| Positivo        | > 11 NTU   | Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).<br>seroconversión después de la vacunación:<br><u>Después de la vacunación</u><br>seroconversión después de la vacunación<br>Verificar los datos de la vacunación, si necesario completar la inmunización de base o la Revacunación  |
| Zona intermedia | 9 – 11 NTU | Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente.<br>Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas.<br>Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como <b>negativa</b> .<br><u>Después de la vacunación</u><br>seroconversión es posible<br>Continuar con la inmunización de base o la revacunación<br>Reacciones no específicas no son excluidas |
| Negativo        | < 9 NTU    | La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.<br><u>Después de la vacunación</u><br>no hay seroconversión después de la vacunación<br>posible después de la primera parte de la vacunación<br>pacientes con resupuesta inmunitaria lenta o ausente   |

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico.

Estos resultados sólo tienen valor restringido en paciente inmunodeprimidos o en neonatos.

#### 9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

| Serología | Significado   |
|-----------|---|
| IgM       | Característica de la respuesta primaria del anticuerpo<br>Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda<br>Raras: → persistente IgM       |
| IgG       | Característica de la respuesta secundario del anticuerpo<br>Pueden persistir por varios años<br>El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada |

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en lo grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto NovaTec Immundiagnostica GmbH.

### 10.1. Precisión

| <b>Intra ensayo</b> | <b>n</b> | <b>Promedio (E)</b>   | <b>CV (%)</b> |
|---------------------|----------|-----------------------|---------------|
| #1                  | 24       | 0,490                 | 8,77          |
| #2                  | 24       | 1,039                 | 7,77          |
| #3                  | 24       | 0,917                 | 11,74         |
| <b>Inter ensayo</b> | <b>n</b> | <b>Promedio (NTU)</b> | <b>CV (%)</b> |
| #1                  | 12       | 18,14                 | 10,86         |
| #2                  | 12       | 15,99                 | 13,26         |
| #3                  | 12       | 2,04                  | 12,56         |

## 10.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 98,29% (95% Intervalo de confianza: 95,07% - 99,65%).

## 10.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 100,0% (95% Intervalo de confianza: 69,15% - 100,0%).

## 10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictéricas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos, de 0,5 mg/ml para bilirrubina y de 10 mg/ml hemoglobina.

## 10.5. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada con otros flavivirus no se puede excluir y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

## 11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

---

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

## 12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

---

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

### 12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

## 13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

---

N° del producto:            TICM0440            TBE/FSME IgM ELISA (96 determinaciones)





## BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

Flaviviridae (2009). In Herbert Hof, Rüdiger Dörries, Gernot Geginat: Medizinische Mikrobiologie. [Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene] ; 237 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe), pp. 207–213.

Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) / Russische Frühjahrs-Sommer-Enzephalitis (2011). In Robert Koch Institut (RKI): Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. Berlin, 14-15.

Amicizia, Daniela; Domnich, Alexander; Panatto, Donatella; Lai, Piero Luigi; Cristina, Maria Luisa; Avio, Ulderico; Gasparini, Roberto (2013): Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. In *Human vaccines & immunotherapeutics* 9 (5), pp. 1163–1171. DOI: 10.4161/hv.23802.

Bienz, Kurt A. (2005): Viruses as Human Pathogen. In Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rolf M. Zinkernagel: Medical microbiology. Stuttgart, New York: Thieme (Thieme Flexibook), pp. 412–474.

Donoso Mantke, O.; Escadafal, C.; Niedrig, M.; Pfeffer, M.; Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus, C. (2011): Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. In *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 16 (39).

Hofmann, H.; Frisch-Niggemeyer, W.; Heinz, F. (1979): Rapid diagnosis of tick-borne encephalitis by means of enzyme linked immunosorbent assay. In *The Journal of general virology* 42 (3), pp. 505–511. DOI: 10.1099/0022-1317-42-3-505.

Hofmann, H.; Heinz, F. X.; Dippe, H. (1983): ELISA for IgM and IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus: quantification and standardization of results. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie = International journal of microbiology and hygiene. A, Medical microbiology, infectious...* 255 (4), pp. 448–455.

Mansfield, Karen L.; Horton, Daniel L.; Johnson, Nicholas; Li, Li; Barrett, Alan D. T.; Smith, Derek J. et al. (2011): Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. In *The Journal of general virology* 92 (Pt 12), pp. 2821–2829. DOI: 10.1099/vir.0.031641-0.

Niedrig, M.; Vaisviliene, D.; Teichmann, A.; Klockmann, U.; Biel, S. S. (2001): Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. In *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 20 (3), pp. 179–182.

Robert Koch Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 17/2011.

Robert Koch-Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 21/2015.

Roggendorf, M. (1990): Frühsommer-Meningoenzephalitis. Wer soll geimpft werden? In *Therapiewoche* 40, pp. 1173–1178.

Roggendorf, M.; Heinz, F.; Deinhardt, F.; Kunz, C. (1981): Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of antibodies of the IgM class. In *Journal of medical virology* 7 (1), pp. 41–50.

## ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

|     |                        |
|-----|------------------------|
| NMP | N-Methyl-2-pyrrolidone |
|-----|------------------------|

**SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS**

|   |  |
|---|--|
|    | Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por   |
| <b>IVD</b>  | In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro  |
| <b>LOT</b>  | Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote  |
|    | Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade  |
|    | Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento  |
| <b>CE</b>   | CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE  |
| <b>REF</b>  | Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo  |
|    | Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização       |
| <b>MTP</b>  | Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaque / Micropiastra / Microplaca / Microplaca   |
| <b>CONJ</b>   | Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado  |
| <b>CONTROL -</b>  | Negative Control / Negativkontrolle / Contrôle négatif / Controllo negativo / Control negativo / Controle negativo   |
| <b>CONTROL +</b>  | Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle positif / Controllo positivo / Control positivo / Controle positivo   |
| <b>CUT OFF</b>  | Cut-off Control / Cut-off Kontrolle / Contrôle cut-off / Controllo cut-off / Control cut-off / Controle cut-off  |
| <b>DIL M</b>  | IgM Sample Diluent / IgM-Probenverdünnungspuffer / Diluant pour échantillon IgM / Tampone diluente IgM / Diluyente para IgM de la muestra / Diluente de Amostra IgM  |
| <b>SOLN STOP</b>  | Stop Solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione bloccante / Solución de parada / Solução de bloqueio  |
| <b>SUB TMB</b>  | TMB Substrate solution / TMB-Substratlösung / Solution de substrat TMB / Soluzione substrato TMB / Solución de sustrato de TMB / Solução substrato TMB   |
| <b>WASH BUF 20x</b>   | Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de lavage concentré 20 x / Tampone di lavaggio concentrazione x20 / Tampón de lavado concentrado x20 / Tampão de lavagem concentrada 20x   |
|  | Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes |



**SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE**

# SCHEME OF THE ASSAY

TBE/FSME IgM ELISA

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.  
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

|  | Substrate Blank<br>(A1) | Negative<br>Control | Cut-off<br>Control | Positive<br>Control | Sample<br>(diluted 1+100) |
|--|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| Negative Control   | -                       | 100 µl              | -                  | -                   | -                         |
| Cut-off Control  | -                       | -                   | 100 µl             | -                   | -                         |
| Positive Control   | -                       | -                   | -                  | 100 µl              | -                         |
| Sample<br>(diluted 1+100)  | -                       | -                   | -                  | -                   | 100 µl                    |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 1 h at 37 °C</b><br>Wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer                  |                         |                     |                    |                     |                           |
| Conjugate  | -                       | 100 µl              | 100 µl             | 100 µl              | 100 µl                    |
| <b>Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C)</b><br>Do not expose to direct sunlight<br>Wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer |                         |                     |                    |                     |                           |
| TMB Substrate solution   | 100 µl                  | 100 µl              | 100 µl             | 100 µl              | 100 µl                    |
| <b>Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25°C) in the dark</b>   |                         |                     |                    |                     |                           |
| Stop Solution  | 100 µl                  | 100 µl              | 100 µl             | 100 µl              | 100 µl                    |
| Photometric measurement at 450 nm<br>(reference wavelength: 620 nm)  |                         |                     |                    |                     |                           |

## NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6  
 63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760  
 Email: info@NovaTec-ID.com  
 Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

TICM0440engl,dt,fr,it,es-05072017-Ka-gr.Lot084