



EIASON[®] Adenovirus IgM



Enzymimmunoassay zur qualitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Adenoviren in Humanserum oder Plasma (Citrat, Heparin)

Anleitung

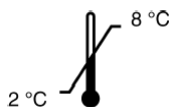
Nur für in-vitro Gebrauch

Produkt von







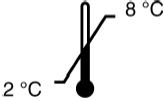











IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
Email: order@iason.eu
www.iason.eu

REF E09-004-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Bedeutung	Symbol	Bedeutung
	In vitro Diagnostikum		Konjugat
	Bestellnummer		Cut Off Kontrolle
	Hergestellt von		Negative Kontrolle
	Lagerung bei		Positive Kontrolle
	Verwendbar bis		Waschpuffer
	Europäische Konformität		Substratlösung
	Chargenbezeichnung		Stopplösung
	Mikrotiterplatte		Probenverdünnungspuffer

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Der EIASON® Adenovirus IgM Kit ist ein Enzymimmunoassay zur qualitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Adenoviren in Humanserum oder Plasma (Citrat, Heparin).

Einleitung

Adenoviren sind hüllenlose Viren von ca. 70-90 nm Größe mit einer doppelsträngigen, linearen DNA. Das Kapsid besteht aus 252 Kapsomeren und zeigt ikosaedrische Symmetrie.

Das Kapsid besteht aus Hexon- und Pentonpolypeptiden sowie aus trimeren Faserproteinen, die für die Induktion gruppen- und typenspezifischer Antikörper ursächlich sind.

Adenoviren wurden 1953 erstmals von Rowe aus Tonsillen und Adenoidgewebe isoliert. Mehr als 80 Adenoviren sind zurzeit bekannt, von denen 47 für den Menschen pathogen sind.

Sie sind Verursacher zahlreicher Erkrankungen verschiedener Organsysteme, wobei hauptsächlich Augen, Pharynx, Respirations- und Gastrointestinaltrakt betroffen sind.

Adenovirus Infektionen sind weit verbreitet und häufig. Die meisten Infektionen treten in der Kindheit auf. Sie verlaufen häufig latent, so dass das Virus noch nach zwei Jahren in den Tonsillen nachgewiesen werden kann. Es wird über Speichel und Fäzes ausgeschieden. Eintrittspforten sind Mund, Nasopharynx und die Konjunktiva des Auges.

Ein Großteil der Infektionen verläuft asymptomatisch.

Etwa 5 % aller „Erkältungskrankheiten“ bei Kindern dürften durch Adenoviren verursacht sein. Akute respiratorische Infektionen treten häufig bei in enger Gemeinschaft lebenden Personen (z.B. Soldaten) auf. Schwimmbad- und Hospitalinfektionen stellen besondere Anforderungen an die Hygiene.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
Adenovirus (1-47)	Infektion der Atemwege: Tonsillitis ,Pharyngitis, Bronchitis, Pneumonie, Pertussis- Syndrom, Pharyngokonjunktivalfieber	Husten, Schnupfen, Schleimproduktion, Fieber	Kontakt mit erregerhaltigem Material, hauptsächlich Tröpfchen und Schmierinfektion; oft in Zusammenhang mit Schwimmbadbesuch (inadäquate Chlorierung)
	Infektion des Auges: epidemische Keratokonjunktivitis, akute hämorrhagische Konjunktivitis	Fremdkörpergefühl, Juckreiz und Brennen, Rötungen und Ödem, Photophobie	
	Infektion des Urogenitalbereichs: Zysitis, akute hämorrhagische Zystitis, Genitalulzera (STD)	Dysurie/Algurie – Schmerzen und Brennen beim Wasserlassen Pollakisurie – häufiger Harndrang mit geringen Urinportionen Hämaturie- das Vorhandensein von roten Blutzellen in dem Urin	
	weitere Infektionen: Säuglingsenteritis, Meningitis		

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Zellkultur
- Virusisolierung
- PCR
- Serologie: z.B. ELISA

Messprinzip

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen das Adenovirus 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 Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift 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.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® Adenovirus IgM Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist) haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs.

Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Unser Produzent prüft humanes Rohmaterial, dass in diesem Kit zum Einsatz kommt auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma IASON GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde.

Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Dieser Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatum stabil. Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2 - 8°C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70° bis -20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

Probenvorverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit **DIL** verdünnen, z.B. 10 µL Probe und 1 mL **DIL** in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

Kitbestandteile

Alle Reagenzien 1 – 9 vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. **MPL Adevovirus beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM)**: 12 teilbare 8-er Streifen, beschichtet mit Adenovirus Antigen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2 - 8 °C lagern.
2. **DIL IgM-Probenvorverdünnungspuffer**: 1 Flasche mit 100 Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; anti-human IgG (RF- Absorbens); grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
3. **STOP Stopplösung**; 1 Fläschchen mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
4. **WASH 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 Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 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.
5. **CONJ Adenovirus anti-IgM-Konjugat**: 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM in Phosphatpuffer (10 mM); rot gefärbt; schwarze Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
6. **SUB Substrat**; 1 Fläschchen mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; < 5 % NMP (N-Methyl-2-pyrrolidone). 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. **PC Adenovirus IgM Positivkontrolle**: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
8. **CUTOFF Adenovirus IgM Cut-off Kontrolle**: 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
9. **NC Adenovirus 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.

Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

Erforderliches Zubehör

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

Testdurchführung

Allgemeine Information

1. Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
2. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
3. Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
4. Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
5. Jeder Lauf muss eine Standardkurve und die Kontrollproben beinhalten.

Testdurchführung

Gebrauchsinformation **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 Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen.

Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) auf **MPL** genau festlegen. Die benötigte Anzahl von **MPL** in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 °C einstellen.

1. Je 100 µL **NC**, **CUTOFF**, **PC** 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 300µL verdünntem **WASH**

waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

5. 100 µL **CONJ** in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100 µL **STOP** in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der **SUB** Zugabe pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der **STOP** messen.

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON® Personallab**
- **IASON® Gladiator**
- **IASON® Quardette**

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 **NC**, **CUTOFF**, **PC** 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.

Ergebnisberechnung

Testgültigkeitskriterien

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

- **Substrat-Leerwert:** Extinktion < **0,100**
- **NC:** Extinktion < **0,200** und < **CUTOFF**
- **CUTOFF:** Extinktionwerte **0,150 – 1,300**
- **PC:** Extinktionswerte > **CUTOFF**

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

Messwertberechnung

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

Beispiel: $0,44 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0,86 : 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

Ergebnisse in Einheiten (IAU – IASON arbiträr Einheiten)

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Einheiten} = \text{IAU}]$

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

Interpretation der Ergebnisse

		IAU
Cut Off	10	-
Grenzwertig	9 - 11	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 negativ .
Negativ	< 9	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.
Postiv	> 11	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.

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.

Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
IgM	Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion Selten: → persistierendes IgM
IgG	Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion.
IgA	Sezerniert in allen Schleimhäuten (⇒ Schutzbarriere) Meist früh im Verlauf einer Infektion gebildet.

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Test Charakteristika

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

Präzision

Intraassay Präzision (n=24)			Interassay Präzision (n=12)		
Probe	Mittelwert [OD]	VK [%]	Probe	Mittelwert [IAU]	VK [%]
1	0,430	4,74	1	19,39	5,27
2	0,874	3,02	2	15,88	7,12
3	0,663	2,4	3	5,31	11,10

Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 97,5% (95% Konfidenzintervall: 92,87% - 99,48%).

Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 90 % (95% Konfidenzintervall: 68,3% - 98,77%).

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 EIASON® Adenovirus IgM.

Kreuzreaktivität

Die Untersuchung eines Probenpanels mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter ließ keine Anzeichen von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Kreuzreaktivitäten erkennen.

Grenzen des Tests

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

Rechtliche Grundlagen

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

1. Adrian, T.; Sassinek, J.; Wigand, Reinhard (1990): Genome type analysis of 480 isolates of adenovirus types 1, 2, and 5. In *Archives of virology* 112 (3-4), pp. 235–248.
2. Bresee, Joseph S.; Glass, Roger I. (2006): Astroviruses, Enteric Adenoviruses, and Other Gastroenteritis Viruses. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 686–693.
3. Donelli, G.; Superti, F.; Tinari, A.; Marziano, M. L.; Caione, D.; Concato, C.; Menichella, D. (1993): Viral childhood diarrhoea in Rome: a diagnostic and epidemiological study. In *The new microbiologica* 16 (3), pp. 215–225.
4. Hierholzer, John C. (1992): Adenoviruses in the immunocompromised host. In *Clinical Microbiology Reviews* 5 (3), pp. 262–274. DOI: 10.1128/CMR.5.3.262.
5. Schmitz, Harald; Wigand, Reinhard; Heinrich, Walter (1983): Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. In *American Journal of Epidemiology* 117 (4), pp. 455–466.
6. Wiegand, R. (1994): Adenovirus. In Henning Brandis, Hans J. Eggers, W. Köhler, Gerhard Pulverer (Eds.): *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*. 7. Aufl. Stuttgart: Fischer; G. Fischer, pp. 767–769.

Arbeitsschema

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen

1. Vorverdünnen	1+100 Sample mit DIL
2. Pipettieren	Vertiefung A1 für Blank freilassen NC , CUTOFF , PC Sample 100µL
3. Inkubieren	1 Std. bei 37°C
4. Waschen	3 x waschen: Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL* verdünnten WASH pipettieren Waschlösung absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen
5. Pipettieren	CONJ außer Blank 100µL
6. Inkubieren	30 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
7. Waschen	3 x waschen: siehe Punkt 4
8. Pipettieren	SUB 100µL
9. Inkubieren	15 min. bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunkeln
10. Pipettieren	STOP 100µL
15. Messen	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Faktor 3 (Photometer abhängig), messen innerhalb 30 min. Auswertung: Mittlere Extinktion der Patientenprobe x 10/Cut-off = [Einheiten=IAU]

* Bitte, erhöhen Sie das Volumen von verdünntem **WASH** auf 350 µL, falls erforderlich.

Erwartete Werte

	IAU
Cut Off	10
Grenzwerte	9 - 11
Negativ	< 9
Postiv	> 11



EIASON® Adenovirus IgM



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Adenovirus in human serum or plasma (citrate, heparin)

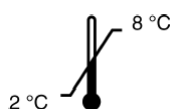
Instruction for use

For in-vitro use only







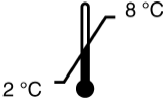









Product of



IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
Email: order@iason.eu
www.iason.eu



Used IFU symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic medical device		Conjugate
	Order number		Cut Off Control
	Manufactured by		Negative Control
	Storage at		Positive Control
	European Conformity		Washing buffer
	Expiry date		Substrate solution
	Lot number		Stop solution
	Microplate		Sample diluent

Intended use

For in-vitro use only.

The EIASON® Adenovirus IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Adenovirus in human serum or plasma (citrate, heparin).

Introduction

Adenoviruses are double-stranded DNA viruses of about 70-90 nm lacking an envelope. The capsid contains 252 capsomeres and shows icosahedral symmetry. The capsomeres consist of hexons, pentons and fiberprotein trimers which are responsible for the induction of group- and type-specific antibodies.

For the first time adenoviruses were isolated in 1953 from tonsils and adenoid tissue by Rowe. More than 80 adenoviruses are known at present. 47 out of them are pathogenic for humans. They cause several diseases of different organic systems, mainly eyes, pharynx, respiratory and gastrointestinal system.

Adenovirus infections are common and frequent. Most infections appear during childhood. They pass off latently so that the virus can still be detected in tonsils after two years. It is excreted via saliva and faeces. Gate to body are mouth, nasal pharynx and conjunctiva of the eye. Most infections pass off without symptoms. Around 5 % of all coughs and sneezes of children are caused by adenoviruses. Epidemics may occur in populations crowded together, for example acute respiratory disease in military groups, pharyngoconjunctival fever in swimming pools, and epidemic keratoconjunctivitis in medical facilities. Infection of hospitals and swimming pools gratify special demands on hygienics.

Species	Disease	Symptoms	Transmission route
Adenovirus (1-47)	<p>Infection of the respiratory system: tonsillitis, pharyngitis, bronchitis, pneumonia, Pertussis syndrome, pharyngoconjunctival fever</p> <p>Infection of the eye: epidemic keratoconjunctivitis, acute haemorrhagic conjunctivitis</p> <p>Infection of the urogenital area: cystitis, acute haemorrhagic cystitis, genital ulcers</p> <p>Other infections: New born enteritis, meningitis</p>	<p>Cough, runny nose, mucus production, fever</p> <p>Foreign body sensation, itching and irritation, redness and edema, photophobia</p> <p>Dysuria / Alguria - pain and burning during watering Pollakiuria - frequent urination with low urine Hematuria- presence of red blood cells in the urine</p>	<p>Contact with infected material. Infection mainly by droplets and smear. Often in connection with swimming pools (inadequate chlorination)</p>

The presence of pathogen or infection may be identified by:

- Cell culture
- PCR
- Serology: e.g. by ELISA
- Virus isolation

Assay principle

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against Adenovirus 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.

Warnings and precautions

The EIASON® Adenovirus IgM kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Damaged test kit

In case of serious damage to the test kit or components, the company IASON must be notified in writing at least one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for the test run. They have to be stored until a final solution has been found.

Shelf life and storage of reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Specimen collection and preparation

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 to -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.

Sample dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with **DIL**. Dispense 10 µL sample and 1 mL **DIL** into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

Materials provided

It is very important to bring all reagents, samples and controls (1-9) to room temperature (20-25°C) before starting the test run!

1. **MPL Adenovirus Coated Wells (IgM)**: 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Adenovirus antigen; in resealable aluminium foil. Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2-8 °C;
2. **DIL IgM Sample Diluent**: 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; antihuman IgG (RF Absorbent); coloured green; ready to use; white cap.
3. **STOP Stop Solution**: 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
4. **WASH 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. Dilute **WASH** 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.
5. **CONJ Adenovirus 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.
6. **SUB TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); <0.1%; ready to use; yellow cap; < 5 % NMP. 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. **PC Adenovirus IgM Positive Control**: 1 bottle containing 2 mL control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; red cap.
8. **CUTOFF Adenovirus IgM Cut-off Control**: 1 bottle containing 3 mL control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; green cap.
9. **NC Adenovirus IgM Negative Control**: 1 bottle 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.

Materials supplied

- 1 cover foil
- 1 instruction for use (IFU)
- 1 plate layout

Materials required but not provided in the kit

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Pipe stand
- Timer

Assay procedure

General remarks

1. All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
3. Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
4. Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
5. As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

Test preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described.

If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects.

Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100 µL [NC], [CUTOFF], [PC] and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±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 [WASH]. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle 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 critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100 µL [CONJ] into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.

6. **Incubate for 30 min at room temperature.** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL **SUB** into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100 µL **STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for the **SUB**. Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the **STOP**.

or automated on:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Quardette**
- **IASON® Gladiator**

Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 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 **NC**, **CUTOFF**, **PC** and patient sample in the plate layout.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

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

Results

Run validation criteria

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

- **Substrate blank:** Absorbance value < **0.100**
- **NC:** Absorbance value < **0.200** and **CUTOFF**
- **CUTOFF:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **PC:** Absorbance value > **CUTOFF**

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

Calculation of results

The cut-off is the mean absorbance value of the cut-off determinations.

Example: Absorbance value cut-off 0.44 + absorbance value cut-off 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
cut-off = 0.43

Results in units (IAU – IASON arbitrary units)

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{cut-off}} = [\text{Units} = \text{IAU}]$$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ IAU}$

Interpretation of results

IAU	
Cut Off	10
Equivocal	9 - 11 Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. 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 negative .
Negative	< 9 The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
Postiv	> 11 Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).

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.

Antibody isotypes and state of infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection
IgA	Produced in mucosal linings throughout the body (⇒ protective barrier) Usually produced early in the course of the infection

Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

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

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON GmbH directly.

Test characteristics

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

Precision

Intraassay Precision (n=24)			Interassay Precision (n=12)		
Probe	Mean [OD]	CV [%]	Probe	Mean [IAU]	CV [%]
1	0.430	4.74	1	19.39	5.27
2	0.874	3.02	2	15.88	7.12
3	0.663	2.4	3	5.31	11.10

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 97.5 % (95% confidence interval: 92.87% - 99.48%).

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 90% (95% confidence interval: 68.3% - 98.77%).

Interferences

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

Cross reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameter did not reveal evidence of false-positive results due to cross-reactions.

Limitations of the procedure

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

Legal aspects***Reliability of results***

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON.

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

Useful publications

1. Adrian, T.; Sassinek, J.; Wigand, Reinhard (1990): Genome type analysis of 480 isolates of adenovirus types 1, 2, and 5. In *Archives of virology* 112 (3-4), pp. 235–248.
2. Bresee, Joseph S.; Glass, Roger I. (2006): Astroviruses, Enteric Adenoviruses, and Other Gastroenteritis Viruses. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 686–693.
3. Donelli, G.; Superti, F.; Tinari, A.; Marziano, M. L.; Caione, D.; Concato, C.; Menichella, D. (1993): Viral childhood diarrhoea in Rome: a diagnostic and epidemiological study. In *The new microbiologica* 16 (3), pp. 215–225.
4. Hierholzer, John C. (1992): Adenoviruses in the immunocompromised host. In *Clinical Microbiology Reviews* 5 (3), pp. 262–274. DOI: 10.1128/CMR.5.3.262.
5. Schmitz, Harald; Wigand, Reinhard; Heinrich, Walter (1983): Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. In *American Journal of Epidemiology* 117 (4), pp. 455–466.
6. Wiegand, R. (1994): Adenovirus. In Henning Brandis, Hans J. Eggers, W. Köhler, Gerhard Pulverer (Eds.): *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*. 7. Aufl. Stuttgart: Fischer; G. Fischer, pp. 767–769.

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature before use

1. Predilution	1+100 Sample with DIL
2. Pipetting	Leave well A1 for blank NC , CUTOFF , PC Sample 100µL
3. Incubation	1 hour at 37°C
4. Washing	wash 3 times: aspirate or decant add 300 µL* diluted WASH repeat wash step 2 x and dry on absorbant material
5. Pipetting	CONJ except blank 100µL
6. Incubation	30 min at room temperature in the dark (20-25°C)
7. Washing	See point 4.
8. Pipetting	SUB 100µL
9. Incubation	15 min. at room temperature (20-25°C) in the dark
10. Pipetting	STOP 100µL
11. Reading	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor 3 (depends on photometer), reading within 30 min. Calculation: $\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{IAU}]$

*Please increase the diluted **WASH** volume to 350 µL if necessary

Expected values

	IAU
Cut Off	10
Equivocal	9 - 11
Negative	< 9
Postive	> 11