



# EIASON<sup>®</sup> FSME (TBE) IgG



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern  
gegen FSME-Viren in Humanserum oder Plasma (Citrat, Heparin)

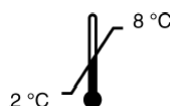
## Anleitung

Nur für in-vitro Gebrauch






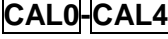
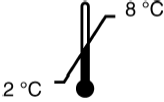







Produkt von

 **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](mailto:order@iason.eu)  
[www.iason.eu](http://www.iason.eu)

REF E09-060-96



### Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Mikrotiterplatte
	Bestellnummer		Probenverdünnungspuffer
	Hergestellt von		Standards
	Lagerung bei		Konjugat
	Verwendbar bis		Waschpuffer
	Europäische Konformität		Substratlösung
	Chargenbezeichnung		Stopplösung

### Verwendungszweck

*Nur für in-vitro Gebrauch.*

Der EIASON® FSME (TBE) IgG Kit ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen FSME-Viren in humanen Serum oder Plasma (Citrat, Heparin).

### Zusammenfassung

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
FSME-Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis	Phase 1: Unspezifische grippeartige Symptome (leichtes Fieber, Kopf-, Muskel, Gliederschmerzen, gastrointestinale Beschwerden)	Stiche von infizierten Zecken (Ixodes ricinus, western subtype; Ixodes persulcatus, eastern subtype); Selten durch infizierte Milch (nicht pasteurisierte)
	CEE (Central European Encephalitis)	Phase 2: hohes Fieber, Entwicklung einer Meningitis und/oder Enzephalitis	

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

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

### Messprinzip

Die quantitative 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 Meerrettich-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.

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® FSME (TBE) IgG Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur 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. Humanes Rohmaterial, das in diesem Kit zum Einsatz kommt, wurde negativ auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper überprüft. 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 vorschriftsmäßiger 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 tiefgefrieren (-70 – -20°C). Wieder aufgetaute 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 vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. **MPL FSME-Virus beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit FSME-Virus 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 IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
3. **STOP Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 M, 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. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2 – 8 °C).
5. **CONJ FSME-Virus anti-IgG-Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
6. **SUB TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; < 5% NMP. 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. **CAL0-CAL4 FSME-Virus IgG Standards:** 5 Fläschchen, mit 2 mL Standardlösung (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; gebrauchsfertig.
 

<b>CAL0:</b>	0	IAU/mL; blaue Verschlusskappe
<b>CAL1:</b>	50	IAU /mL; grüne Verschlusskappe
<b>CAL2:</b>	130	IAU /mL; gelbe Verschlusskappe
<b>CAL3:</b>	200	IAU /mL; rote Verschlusskappe
<b>CAL4:</b>	300	IAU /mL; weiße Verschlusskappe

IAU = IASON arbiträre Einheiten

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

## Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

### Erforderliches Zubehör

- Kalibriertes Mikrotiterplatten Photometer mit Filtern 450/620 (oder IASON Vollautomat)
- Inkubator 37°C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

### Testdurchführung

#### Allgemeine Informationen

1. Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt 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

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 Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen.*

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 **CAL0**-**CAL4** 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 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 **STOP** messen.

oder vollautomatisiert auf:

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

## 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 **CAL0-CAL4** 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.

## Testgültigkeitskriterien

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

<b>Substrat-Leerwert</b>	Extinktion < <b>0,100</b>
<b>CAL0</b>	Extinktion < <b>0,200</b>
<b>CAL1</b>	Extinktion > <b>0,050</b>
<b>CAL2</b>	Extinktion > <b>CAL1</b>
<b>CAL3</b>	Extinktion > <b>CAL2</b>
<b>CAL4</b>	Extinktion > <b>1,000</b>

$$\mathbf{CAL0} < \mathbf{CAL1} < \mathbf{CAL2} < \mathbf{CAL3} < \mathbf{CAL4}$$

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

### Messwertberechnung

Um quantitative Ergebnisse in IAU/mL zu erhalten, die Extinktionswerte der fünf Standards CAL0-CAL4 gegen ihre entsprechende Konzentration (0, 50, 130, 200, 300 IAU/mL) auftragen und eine Standardkurve erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

Anhand dieser Standardkurve Ergebnisse die gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Zur Berechnung der Standardkurve sollte die mathematische „Punkt zu Punkt“ Funktion gewählt werden.

### Interpretation der Ergebnisse

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Patientenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden. Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

IAU/mL		
Grenzwertig	55 - 110	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> . <b><u>Nach Impfungen</u></b> Serokonversion nach Impfung möglich; mit der Grundimmunisierung fortfahren bzw. Auffrischen unspezifische Reaktionen sind nicht ausgeschlossen
Negativ	< 55	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich. <b><u>Nach Impfungen</u></b> keine Serokonversion nach Impfung; möglich nach der ersten Teilimpfung bei Grundimmunisierung; Patienten mit langsamer oder fehlender Impfantwort
Postiv	> 110	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden. <b><u>Nach Impfungen</u></b> Serokonversion nach Impfung Impfdaten prüfen, wenn nötig Grundimmunisierung vervollständigen bzw. Auffrischen.

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.



## 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	1,411	3,51	1	26,55	9,18
2	1,991	2,23	2	15,38	12,99
3	1,913	8,93	3	253,81	10,48

### Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100,0% (95% Konfidenzintervall: 93,84% - 100,0%).

### Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100,0% (95% Konfidenzintervall: 96,31% - 100,0%).

**Analytische Sensitivität**

Die analytische Sensitivität des Tests (gemäß CLSI EP17-A) ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie ist 1,78 IAU/mL.

**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.

**Kreuzreaktivität**

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

**Messbereich**

Der Messbereich ist 1,78 IAU/mL – 300 IAU/mL.

**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. 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.
2. Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) / Russische Frühjahrs-Sommer-Enzephalitis (2011). In Robert Koch Institut (RKI): Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. Berlin, 14-15.
3. 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.
4. 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.
5. Donoso Mantke, O.; Escadafal, C.; Niedrig, M.; Pfeffer, M.; Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus, C. (2011): Tickborne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. In *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 16 (39).
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Niedrig, M.; Vaisviliene, D.; Teichmann, A.; Klockmann, U.; Biel, S. S. (2001): Comparison of six different commercial IgGELISA 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.
10. Robert Koch Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 17/2011.
11. Robert Koch Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 21/2015.
12. Roggendorf, M. (1990): Frühsommer-Meningoenzephalitis. Wer soll geimpft werden? In *Therapiewoche* 40, pp. 1173–1178.
13. 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.

## Arbeitsschema

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Proben 1+100 mit **DIL** verdünnen. Optional: A1 für Substratleerwert freilassen.

1. Pipettieren	<b>CAL0-CAL4</b> <b>100 µL</b>	Verdünnte Proben <b>100 µL</b>
2. Inkubieren	Platte abdecken. 1 Stunde bei 37°C	
3. Waschen	Waschschritt 3x : Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL* verdünnten <b>WASH</b> pipettieren Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen	
4. Pipettieren	<b>CONJ</b>	(außer Blank) <b>100 µL</b>
5. Inkubieren	30 min bei Raumtemperatur (20-25°C)	
6. Waschen	Waschschritt 3 x : siehe Punkt 3	
7. Pipettieren	<b>SUB</b>	<b>100 µL</b>
8. Inkubieren	15 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunkeln	
9. Waschen	<b>STOP</b>	<b>100 µL</b>
10. Messen	450 nm (RF 620nm) Optional Overage Filter: 405 nm, Faktor: 3 (vom Photometer abhängig), innerhalb von 30 Min. Messen Berechnung: 4-Parameter oder Punkt für Punkt	

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

## Erwartete Werte

	IAU/mL
Negativ	<55
Graubereich	55 – 110
Positiv	>110



# EIASON<sup>®</sup> FSME (TBE) IgG



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG-class antibodies against TBE-Virus in human serum or plasma (citrate, heparin)

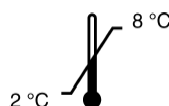
## Kit instruction

For in-vitro use only






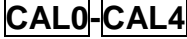
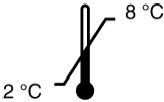







Product of



**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](mailto:order@iason.eu)  
[www.iason.eu](http://www.iason.eu)



## Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Microplate
	Order number		Sample diluent
	Product of		Calibrators
	Storage		Substrate solution
	European Conformity		Enzym conjugate
	Expiry date		Stop solution
	Batch code		Washing buffer

## Intended use

*For in-vitro use only.*

The EIASON® FSME (TBE) IgG ELISA is intended for the quantitative determination of IgG class antibodies against TBE virus in human serum or plasma (citrate, heparin).

## Summary

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-Virus	Tick-borne encephalitis  CEE (Central European Encephalitis)	Phase 1: unspecific flu-like symptoms (mild fever, headache, muscle pain, joint pain, gastrointestinal complaints) 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). Rarely by infected (nonpasteurized) milk.

The presence of pathogen or infection may be identified by:

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

### Assay principle

The quantitative 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.

### Warnings and precautions

The EIASON® FSME (TBE) IgG ELISA 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.

### 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. Do not use reagents beyond this date.

### Storage and preparation of serum samples

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 – -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

*Allow all reagents to reach room temperature before use.*

1. **MPL TBE-Virus Coated Wells (IgG)**: 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with TBE-Virus antigen; in resealable aluminium foil. 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.
2. **DIL IgG Sample Diluent**: 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10mM) for sample dilution; containing anti human-IgG; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; 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 Solution (20 x 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 washing solution 1+19; e.g. 10 mL washing solution + 190 mL distilled water. The diluted buffer will keep for 5 days if stored at room temperature. Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. Mix well before dilution.
5. **CONJ TBE-Virus anti-IgG Conjugate**: 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer; coloured blue; 10 mM; ready to use; black cap.
6. **SUB TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine (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. **CAL0-CAL4 TBE Virus IgG Standards**: 5 vials, each containing 2 mL standard (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use:  
**CAL 0**: 0 IAU/mL; blue cap



CAL 1:	50	IAU/mL; green cap	
CAL 2:	130	IAU/mL; yellow cap	[IAU = IASON arbitrary units]
CAL 3:	200	IAU/mL; red cap	
CAL 4:	300	IAU/mL; white 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 (or IASON fully automated instrument)
- 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
- 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.
6. Each assay run must include a standard curve and controls.

#### Test procedure

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 **CAL0**-**CAL4** 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 important! Insufficient washing results in poor precision and false results.*

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.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL **STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for the **SUB** thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the **STOP**.

or fully automated on:

- **IASON<sup>®</sup> Quardette**
- **IASON<sup>®</sup> PersonalLab**
- **IASON<sup>®</sup> 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 **CAL1**-**CAL4** 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.

## Run validation criteria

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

<b>Substrate BLANK</b>	Absorbance < <b>0.100</b>
<b>CAL0</b>	Absorbance < <b>0.200</b>
<b>CAL1</b>	Absorbance > <b>0.050</b>
<b>CAL2</b>	Absorbance > <b>CAL1</b>

$\frac{\text{CAL3}}{\text{CAL4}}$  Absorbance >  $\frac{\text{CAL2}}{1.000}$   
 Absorbance > 1.000

$\text{CAL0} < \text{CAL1} < \text{CAL2} < \text{CAL3} < \text{CAL4}$

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

### Calculation of results

In order to obtain quantitative results in IAU/mL plot the (mean) absorbance values of the 5 Standards  $\text{CAL0}$ - $\text{CAL4}$  on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0, 50, 130, 200 and 300 IAU/mL) and draw a standard calibration curve (absorbance values on the vertical y-axis, concentrations on the horizontal x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each patient sample.

For the calculation of the standard-curve mathematical Point to Point function should be used.

### Results interpretation

	IAU/mL	
Grey zone	55 - 110	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 unequivocal again the sample is judged as negative. <b>After vaccination:</b> This may be a case of seroconversion. Continue with basic immunisation or booster. Repeat test within 2-4 weeks. A non-specific reaction is not excluded
Negativ	< 55	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely. <b>After vaccination:</b> No seroconversion after vaccination. This may be the case after the first vaccination during basic immunisation. Patients which show low or no response.
Postiv	> 110	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine). <b>After vaccination:</b> This is a case of seroconversion. Check anamnestic data and if necessary complete basic immunization or give a booster.

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**

---

<b>Serology</b>	<b>Significance</b>
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

---

**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	1.411	3.51	1	26.55	9.18
2	1.991	2.23	2	15.38	12.99
3	1.913	8.93	3	253.81	10.48

***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 100.0% (95% confidence interval: 93.84% - 100.0%).

***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: 96.31% - 100.0%).

***Analytical sensitivity***

The analytical sensitivity (according to CLSI EP17-A) is defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator. It is 1.78 IAU/mL.

***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.

***Cross reactivity***

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

***Measurement range***

The measurement range is 1.78 IAU/mL – 300 IAU/mL.

***Limitation of use***

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample 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.

## Literature

1. 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.
2. Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) / Russische Frühjahrs-Sommer-Enzephalitis (2011). In Robert Koch Institut (RKI): Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. Berlin, 14-15.
3. 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.
4. 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.
5. Donoso Mantke, O.; Escadafal, C.; Niedrig, M.; Pfeffer, M.; Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus, C. (2011): Tickborne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. In *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 16 (39).
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Niedrig, M.; Vaisviliene, D.; Teichmann, A.; Klockmann, U.; Biel, S. S. (2001): Comparison of six different commercial IgGELISA 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.
10. Robert Koch Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 17/2011.
11. Robert Koch-Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 21/2015.
12. Roggendorf, M. (1990): Frühsommer-Meningoenzephalitis. Wer soll geimpft werden? In *Therapiewoche* 40, pp. 1173–1178.
13. 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.

## Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature before use

Dilute all samples 1+100 with **DIL**.  
Optional: Leave A1 for substrate-Blank

1. Pipetting	<b>CAL 0-4</b> <b>100 µL</b>	Diluted samples <b>100 µL</b>
2. Inkubation	1 hour at 37°C	
3. Washing	wash 3 x: aspirate or decant add <b>300 µL</b> of diluted <b>WASH</b> aspirate or decant and dry on an absorbent material	
4. Pipetting	<b>CONJ</b> (except blank)	<b>100 µL</b>
5. Inkubation	30 min at room temperature (20-25°C)	
6. Washing	wash 3 x: See point 3.	
7. Pipetting	<b>SUB</b>	<b>100 µL</b>
8. Inkubation	15 min. at room temperature (20-25°C) in the dark	
9. Washing	<b>STOP</b>	<b>100 µL</b>
10. Messen	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor 3 (depends on photometer), reading within 30 min. Calculation: 4 parameter or point to point	

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

### Expected values

	IAU/mL
Negative	< 55
Grey zone	55 – 110
Positive	>110