

MASTAZYME™ FSME IgG

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung
von humanen IgG Antikörpern gegen das FSME (TBE) Virus
in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification
of human IgG antibodies against TBE Virus (Tick-Borne Disease)
in serum and plasma

Test immunoenzymatique pour la détection et la quantification
des anticorps IgG anti-TBEV (virus de l'encéphalite à tiques)
dans le sérum et le plasma

Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /
Usage *in vitro* uniquement



Deutsch: Seiten 03–08



English: Pages 09–14



Français: Pages 15–21

MASTAZYME™ FSME/TBE IgG

REF 680501






12 x 8 Tests

Lagerung / Storage / Conservation : 2°- 8 °C

Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:

Explanations of abbreviations and icons used on labels:

Explications des abréviations et icônes sur les étiquettes:

STRIPS		Mikrotiterstreifen	Microtiter strips	Films pour microplaque
CONTR	+	Positive Kontrolle	Positive control	Contrôle positif
CONTR	-	Negative Kontrolle	Negative control	Contrôle négatif
CAL	1-4	Kalibrator 1-4	Calibrator 1-4	Calibrateur 1-4
CONJ		HRP-Konjugat	HRP conjugate	Conjugué
DIL		Probenverdünnungspuffer	Sample diluent	Diluant d'échantillon
SUBS		TMB-Substrat	TMB substrate	TMB substrat
STOP		Stopp-Lösung	Stopping solution	Solution d'arrêt
WASH	CONC	Waschpuffer, konzentriert	Washing buffer, concentrate	Solution de lavage, concentrée
LOT		Charge	Batch	Lot
		Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
		Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarque importante
		Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption
		Lagerung bei	Storage	Conservation
		Reagenzien nicht zur Wiederverwendung geeignet	Reagents not reusable	Ne pas réutiliser les réactifs

	Inhalt	Seite
1.	Verwendungszweck	4
2.	Testprinzip	4
3.	Packungsinhalt	4
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	5
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	5
6.	Lagerung und Stabilität	6
7.	Probengewinnung und -handhabung	6
8.	Testdurchführung	6
9.	Auswertung und Interpretation	7
10.	Testcharakteristika	8
11.	Literatur	8

1. Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ FSME IgG dient dem Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen das FSME Virus in Serum oder Plasma. Die Verwendung des ELISAs für andere Körperflüssigkeiten kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. MASTAZYME™ FSME IgG ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

2. Testprinzip

Das Testprinzip der ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

1.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

1.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30-minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

1.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 20 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 N Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

1.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete elektronische Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o.ä.) ermittelt werden.

3. Packungsinhalt

Das Testkit enthält genügend Reagenzien für 12 x 8 = 96 Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet mit FSME Antigen
----	----------	---

1 x	Rahmen
-----	--------

4 x 1,5 mL	Kalibratoren 1–4	Stabilisiertes humanes Plasma, enthält antigenspezifische Antikörper, gebrauchsfertig
------------	------------------	---

	Anti-FSME IgG Konzentration [VU/mL]
Kalibrator 1	1
Kalibrator 2 (Cut-off)	100
Kalibrator 3	400
Kalibrator 4	1600
Positive Kontrolle	800
Negative Kontrolle	50

1 x 1,5 mL	Negative Kontrolle	Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden
1 x 1,5 mL	Positive Kontrolle	Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden
2 x 60 mL	Probenverdünnungspuffer	PBS Puffer mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG (Ziege), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	0,5 N H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
2 x 50 mL	Waschpuffer 10 x Konz.	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, evtl. vor Gebrauch kurz auf 37 °C erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen

4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.

- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Laborgereäte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfalldatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden. Er muss allerdings vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Nach dem Öffnen ist das angebrochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Probenverdünnungspuffer 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden.

8. Testdurchführung

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.

Waschpuffer: Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 50 mL Konzentrat + 450 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MP-Streifen sollten in der Hülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

8.2. Testablauf

Hinweis: Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben, gebrauchsfertigen Kalibratoren und Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen bei RT für 60 Minuten inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen bei RT für 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden, ca. 5 Minuten stehenlassen.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch anhand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

9. Auswertung und Interpretation

Beispiel: IgG Kalibratorkurve (VU*/mL)

	VU/mL	OD 450 nm
Kal. 1	1	0,009
Kal. 2 (Cut-off)	100	0,835
Kal. 3	400	1,821
Kal. 4	1600	2,454
Positive Kontrolle	800	2,154
Negative Kontrolle	50	0,483

* VU = Vienna Units

Die obige Tabelle dient als Beispiel. Die Daten beschreiben keine Werte, die in anderen Laboratorien erhalten wurden. **Die Daten dürfen nicht zur Erstellung einer Eichkurve verwendet werden.**

9.1. Qualitative Auswertung

Die berechnete Absorption der Probe wird mit der des Cut-off Kalibrators verglichen. OD-Werte über dem Cut-off sind als positiv, Werte unterhalb der Cut-off OD als negativ zu bewerten.

Werte im Bereich der Cut-off OD ($\pm 10\%$) sind als Graubereich zu betrachten. Es wird empfohlen, die Bestimmung zu wiederholen oder 2–4 Wochen später eine neue Patientenprobe zu analysieren. In diesem Fall sollten beide Proben innerhalb eines Testlaufs untersucht werden.

9.2 Quantitative Auswertung

Die Konzentrationen des MASTAZYME™ FSME IgG werden in VU angegeben. Die exakten Konzentrationen sind auf den Etiketten der Kalibratoren angegeben. Die Extinktion wird entweder graphisch oder mittels Computersimulation gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen und die Konzentration der Patientenprobe direkt abgelesen oder berechnet.

Die quantitative Bestimmung der Antikörper gegen das FSME Virus ermöglicht eine einfache zuverlässige Überwachung der entsprechenden Antikörpertiter zur Verlaufskontrolle.

10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika des MASTAZYME™ FSME IgG ELISAs wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

11. Literatur

1. Ackermann R et al. Die Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Dtsch. med. Wschr 111: 927 (1986).
2. Ackermann R et al. Die Zentraleuropäische Enzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Fortschr. Neurol. Psychiat. 47: 103 (1979).
3. Baumberger P et al. Development of early-summer meningoencephalitis (FSME) in the Thurgau region 1990–1995 – a new endemic area; Schweiz. Med. Wochenschr. 126: 2072 (1996).
4. Burkhardt U et al. Viral infections - clinical pictures and laboratory diagnosis. Part 2: Coxsackie B virus, echovirus, enteroviruses, EBV, FSME virus and yellow fever virus; Fortschr. Med. 111: 510 (1993).
5. Chlabicz S et al. Clinical picture of tick-borne encephalitis among patients hospitalised in 1994; Roczn. Akad. Med. Białymst. 41: 35 (1996).
6. Grubbauer HM et al. Tick-borne encephalitis in a 3-month-old child; Europ. J. Pediatr. 151: 743 (1992).
7. Haglund M et al. A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: Need for a vaccination strategy; Scand. J. Infect. Dis. 28: 217 (1996).
8. Harabacz I et al. A randomised phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunisation regimens; Vaccine 10: 145 (1992).
9. Hug B et al. A case from practice (362). Early summer meningitis. FSME-IgG and IgM-positive; Schweiz. Rundsch. Med. Prax., 85: 1495 (1996).
10. Müller KD et al. Serological studies of early summer meningoencephalitis risk in the Saarland; Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A] 264: 201 (1987).

Contents	Page
1. Intended use	10
2. Principle of the Test	10
3. Kit Contents	10
4. Materials Required but not Provided	11
5. Warnings and Precautions	11
6. Storage and Stability	12
7. Specimen Collection and Handling	12
8. Assay Procedure	12
9. Results and Interpretation	13
10. Assay Performance	14
11. References	14

1. Intended Use

MASTAZYME™ FSME IgG (TBE Virus = Tick-Borne Disease Virus) Antibody ELISA has been designed for the detection and the quantification of specific IgG antibodies respectively against TBE Virus in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be provided on request.

This assay is intended for *in vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

2. Principle of the Test

The ELISA test can be described in four stages:

1.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to antigen on the solid phase to form a stable immune complex. After incubation for 60 minutes at room temperature the wells are washed with a prediluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

1.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After incubating for 30 minutes at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with wash buffer.

1.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and consequent colour development is stopped after a 20 minutes incubation at room temperature by adding 0.5 N H₂SO₄ to the wells. The shift in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

1.4 Reading and interpretation

The colour intensity is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

The results can be read from a calibration curve or with an electronic graphing package using a 4 parameter sigmoidal curve.

3. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. Kit components should be stored at 2–8 °C. The expiry date is shown on the individual labels.

12	Microtiter strips	Single strips each with 8 break-apart wells coated with the antigen of TBE Virus respectively.
1 x	Frame holder	
4 x 1,5 mL	Calibrators 1–4	Stabilized human plasma containing antibodies against the above antigens and pre-diluted in buffer. Ready to use (RTU).

	Anti-FSME IgG concentration [VU/mL]
Calibrator 1	1
Calibrator 2 (Cut-off)	100
Calibrator 3	400
Calibrator 4	1600
Positive Control	800
Negative Control	50

1 x 1,5 mL	Negative Control	Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve.
1 x 1,5 mL	Positive Control	Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve.
2 x 60 mL	Sample diluent	PBS solution with preservative, ready to use.
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG, ready to use.
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use.
1 x 12 mL	Stopping solution	0.5 N sulfuric acid, ready to use.
2 x 50 mL	Wash buffer 10 x concentrated	PBS/Tween buffer solution 10x concentrated. To be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 min to dissolve any crystals

4. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micropipettes and a multichannel pipette (optional).
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter plate washer (if washing manually: wash bottle)
- Reagent tubes for serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of similar or better quality

5. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera, plasma and buffers containing human biological material were found to be negative for Hepatitis B, C and HIV. Nevertheless, precautions such as the use of latex gloves must be taken.
- Serum and reagent spills should be cleaned with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and the refuse disposed of appropriately.
- All reagents should be brought to room temperature (18 to 24 °C) before starting the test procedure.
- Before pipetting, all reagents should be mixed thoroughly by gentle agitation. Vigorous shaking leading to formation of foam should be avoided.

- It is important to pipette with constant time intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same reaction conditions.
- When pipetting reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Furthermore, disposable pipette tips are strongly recommended to avoid cross-contamination. The contents of the bottles are usually sensitive to oxidation so should be opened only for a short time.
- No reagents from different kit batches should be used and reagents should not be mixed with one another.
- All reagents should be used within the listed shelf life.
- In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or measurement (ELISA Reader) instrumentation.
- Certain reagents (especially the stop solution and substrate) are irritants- avoid contact with skin, eyes and mucosal membranes. In case of accident, rinse with water and seek medical attention. Clean all equipment after use to avoid secondary contact incidents.

6. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted wash buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C. However ensure that this is at room temperature before testing.

Kits should be used within three months of opening.

7. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for testing. Samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days, although for longer storage periods they should be aliquoted and kept at -20 °C. Repeated freezing and thawing is contra-indicated. Lipaemic, haemolytic, icteric and bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera should be prediluted 1:101 in sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent) prior to testing.

8. Assay Procedure

8.1. Preparation of Reagents

Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.

Washing buffer: Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 50 mL buffer concentrate + 450 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. The user takes sole responsibility for any modifications to the test procedure.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.

- A standard calibration curve should be established with each assay.
- Replace any unused microtiter strips in the resealable aluminium bag provided and store under dry conditions at 2–8 °C.

8.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the calibrators, controls and samples.

Note: Other incubation conditions are possible. However in case of modifications to the recommended test procedure (e.g. an incubation temperature of 37 °C instead of RT) assay performance should be validated by the user.

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use calibrators and controls into the appropriate wells.
2. Incubate the test plate at room temperature for 60 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Incubate the test plate for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
7. Pipette 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Incubate for 20 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended. Concentrations can be plotted with an electronic graphing package or by hand against the calibration curve.

The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

9. Results and Interpretation

Example for IgG calibrator curve

	VU/mL*	OD 450 nm
Cal. 1	1	0.009
Cal. 2 (Cut-off)	100	0.835
Cal. 3	400	1.821
Cal. 4	1600	2.454
Positive Control	800	2.154
Negative Control	50	0.483

* VU = Vienna Units

The table above should be considered as an example which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. **These data do NOT describe reference values which have to be found in other laboratories in the same way!**

Qualitative

The calculated OD values for patient sera as mentioned above are compared with the value for the cut-off calibrator. If the value of the sample is higher, then it should be read as positive.

A value below the cut-off calibrator should be read as negative. It seems reasonable to define a range of $\pm 10\%$ around the OD value of the cut-off as a grey zone. It is recommended to repeat results laying within the grey zone using the same serum or a new sample of the same patient, taken after 2–4 weeks. Both samples should be measured in parallel in the same run.

Quantitative

The ready to use calibrators of MASTAZYME FSME IgG are defined and values are expressed in Vienna Units (VU/mL). This gives access to an exact and reproducible quantification and in consequence patient antibody titer monitoring is possible. Concentration values for calibrators are printed on the labels of the vials.

The calculation of the result can be performed using a computer and a suitable software program.

10. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME™ FSME IgG ELISA have been established and assessed according the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

11. References

1. Ackermann R et al. Die Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Dtsch. med. Wschr. 111: 927 (1986).
2. Ackermann R et al. Die Zentraleuropäische Enzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Fortschr. Neurol. Psychiat. 47: 103 (1979).
3. Baumberger P et al. Development of early-summer meningoencephalitis (FSME) in the Thurgau region 1990–1995 – a new endemic area; Schweiz. Med. Wochenschr. 126: 2072 (1996).
4. Burkhardt U et al. Viral infections - clinical pictures and laboratory diagnosis. Part 2: Coxsackie B virus, echovirus, enteroviruses, EBV, FSME virus and yellow fever virus; Fortschr. Med. 111: 510 (1993).
5. Chlabicz S et al. Clinical picture of tick-borne encephalitis among patients hospitalised in 1994; Roczn. Akad. Med. Białymst. 41: 35 (1996).
6. Grubbauer HM et al. Tick-borne encephalitis in a 3-month-old child; Europ. J. Pediatr. 151: 743 (1992).
7. Haglund M et al. A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: Need for a vaccination strategy; Scand. J. Infect. Dis. 28: 217 (1996).
8. Harabacz I et al. A randomised phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunisation regimens; Vaccine 10: 145 (1992).
9. Hug B et al. A case from practice (362). Early summer meningitis. FSME-IgG and IgM-positive; Schweiz. Rundsch. Med. Prax., 85: 1495 (1996).
10. Müller KD et al. Serological studies of early summer meningoencephalitis risk in the Saarland; Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A] 264: 201 (1987).

Sommaire	Page
1. Domaine d'utilisation	16
2. Principe du test	16
3. Composition du coffret	16
4. Matériel nécessaire mais non fourni	17
5. Précautions d'utilisation	17
6. Conservation et stabilité	18
7. Prélèvement et transport des échantillons	18
8. Procédure ELISA	19
9. Résultats et interprétation	20
10. Performances du test	20
11. Bibliographie	21

1. Domaine d'utilisation

MASTAZYME FSME IgG Antibody ELISA a été conçu pour la détection et la quantification des anticorps IgG anti-TBEV (TBE Virus = Tick-Borne Disease Virus) dans le sérum et le plasma. Des applications supplémentaires sur d'autres prélèvements biologiques sont possibles et peuvent être fournies sur demande.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

2. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

2.1 Incubation des sérums

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage prédiluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

2.2 Incubation du conjugué

Le conjugué anti-IgM humaines marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgM des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage.

2.3 Réaction du substrat et de la solution stop

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppé après 20 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique (H₂SO₄) 0,5 N dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

2.4 Lecture et interprétation

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique: 600–690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

3. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 2–8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12	Barrettes	Barrettes de 8 puits sécables sensibilisées avec l'antigène purifié du virus TBE.
1 x	Cadre pour microplaque	
4 x 1,5 mL	Calibrateurs 1–4	Plasma humain stabilisé contenant les anticorps dirigés contre les antigènes spécifiques, prédilué dans un tampon. Prêt à l'emploi.

	Titre en IgG Anti-FSME I [UV/mL]
Calibrateur 1	1
Calibrateur 2 (Seuil)	100
Calibrateur 3	400
Calibrateur 4	1600
Contrôle positif	800
Contrôle négatif	50

1 x 1,5 mL	Contrôle négatif	Plasma humain stabilisé prêt à l'emploi pouvant être intégré à la courbe de calibration.
1 x 1,5 mL	Contrôle positif	Plasma humain stabilisé prêt à l'emploi pouvant être intégré à la courbe de calibration.
2 x 60 mL	Diluant Echantillon	Soution PBS prête à l'emploi.
1 x 12 mL	Conjugué	IgG anti-humaine de chèvre conjugué à la peroxydase du Raifort, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Substrat TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Solution d'arrêt	Solution d'acide sulfurique 0,5N , prête à l'emploi.
2 x 50 mL	Tampon de lavage concentré 10X	Solution tampon PBS/Tween concentrée 10X, à diluer au 1/10 avant utilisation. La solution concentrée doit être chauffée à 37°C pendant 15 minutes pour dissoudre tous les cristaux.

4. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5 µL, 100 µL et 500 µL
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600–690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel: pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

5. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex: eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18–24 °C) avant de commencer le test.

- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Eviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaques soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs. Eviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouverts le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au-delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Eviter le contact de la solution stop et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.

6. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2–8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2–8 °C. Cependant, vérifier qu'elle est bien à température ambiante avant utilisation.

Une fois ouvert le kit doit être utilisé dans les 3 mois.

7. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 3 jours à 2–8 °C. Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyperlipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être prédilué au 1:101 dans le diluant des sérums (ex: 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

Les échantillons ayant des concentrations supérieures au plus fort calibrateur doivent être redilués dans le diluant des sérums.

8. Procédure ELISA

8.1. Préparation des réactifs

Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18-24°C) avant utilisation et bien les mélanger.

Solution de lavage: Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37 °C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au 1:10 avec de l'eau distillée (ex: 50 mL de solution de lavage concentrée + 450 mL d'eau distillée). Mélanger minutieusement

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.

8.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour les calibrateurs, les contrôles et les échantillons.

Remarque : D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex: incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.

1. Déposer 100 µL de chaque échantillon dilué (1:101) et de chaque calibrateur prêt à l'emploi dans les puits appropriés.
2. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 60 minutes.
3. Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
4. Déposer 100 µL de conjugué dans chaque puits.
5. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Eliminer ensuite les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber pendant 20 minutes dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
10. Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et lire la densité optique à 450 nm. Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600–690 nm est recommandée.

La couleur est stable pendant au moins 30 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.

9. Résultats et interprétation

Exemple de courbe de calibration IgG

	UV/mL*	DO 450 nm
Cal. 1	1	0,009
Cal. 2 (Seuil)	100	0,835
Cal. 3	400	1,821
Cal. 4	1600	2,454
Contrôle positif	800	2,154
Contrôle négatif	50	0,483

9.1. Résultats qualitatifs

Les valeurs de DO nettes calculées pour les sérums des patients sont comparées avec la valeur du calibrateur seuil. Si la valeur de l'échantillon est supérieure à la valeur du seuil, le résultat est positif.

Si la valeur de l'échantillon est inférieure à celle du seuil, le résultat est négatif. Il semble raisonnable de définir une zone de $DO \pm 10\%$ autour de la valeur du seuil comme zone grise. Il est recommandé de répéter les tests pour les échantillons dont la OD valeur se situe dans cette zone grise en utilisant le même sérum ou avec un nouvel échantillon prélevé 2 à 4 semaines après. Les deux échantillons peuvent être testés en parallèle dans la même série.

La valeur du calibrateur positif doit être au moins du double de celle du seuil.

9.2. Résultats quantitatifs

Les calibrateurs prêts à l'emploi du coffret MASTAZYME FSME IgG sont définis en Unités de Vienne pour les IgG. Ceci donne accès à une quantification exacte et reproductible permettant de suivre l'évolution du titre en anticorps. Les concentrations des calibrateurs sont imprimées sur les étiquettes des flacons.

Tracer la courbe étalon en portant les concentrations des calibrateurs sur l'axe des abscisses et la valeur moyenne d'absorbance correspondante sur l'axe des ordonnées. La concentration en anticorps du sérum du patient peut être lue directement sur la courbe.

Le calcul des résultats peut être fait en utilisant un ordinateur et le logiciel correspondant.

10. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME FSME IgG ELISA ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale.

11. Bibliographie

- a. Ackermann R et al. Die Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Dtsch. med. Wschr 111: 927 (1986).
- b. Ackermann R et al. Die Zentraleuropäische Enzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Fortschr. Neurol. Psychiat. 47: 103 (1979).
- c. Baumberger P et al. Development of early-summer meningoencephalitis (FSME) in the Thurgau region 1990–1995 – a new endemic area; Schweiz. Med. Wochenschr. 126: 2072 (1996).
- d. Burkhardt U et al. Viral infections - clinical pictures and laboratory diagnosis. Part 2: Coxsackie B virus, echovirus, enteroviruses, EBV, FSME virus and yellow fever virus; Fortschr. Med. 111: 510 (1993).
- e. Chlabicz S et al. Clinical picture of tick-borne encephalitis among patients hospitalised in 1994; Roczn. Akad. Med. Białymst. 41: 35 (1996).
- f. Grubbauer HM et al. Tick-borne encephalitis in a 3-month-old child; Europ. J. Pediatr. 151: 743 (1992).
- g. Haglund M et al. A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: Need for a vaccination strategy; Scand. J. Infect. Dis. 28: 217 (1996).
- h. Harabacz I et al. A randomised phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunisation regimens; Vaccine 10: 145 (1992).
- i. Hug B et al. A case from practice (362). Early summer meningitis. FSME-IgG and IgM-positive; Schweiz. Rundsch. Med. Prax., 85: 1495 (1996).
- j. Müller KD et al. Serological studies of early summer meningoencephalitis risk in the Saarland; Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A] 264: 201 (1987).

Notizen / Notes / Note:

manufactured by

**Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
D 823858 Reinfeld
Deutschland**

**Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
e-mail: mast@mast-diagnostica.de**

distributed by

**Mast Group Ltd.
MAST House
Derby Road, Bootle
Mersey Side L20 1EA
United Kingdom**

**Tel.: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
e-mail: sales@mastgrp.com**

distributed by

**Mast Diagnostic
115, Rue Jules Barni
CS 91106
80011 AMIENS CEDEX 1
France**

**Tel.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
e-mail: info@mast-diagnostic.fr**