




Serazym[®] Anti-Francisella tularensis

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern gegen das Lipopolysaccharid (LPS) aus *Francisella tularensis* in Serum humanen Ursprungs

REF	E-049		96
IVD	In-vitro-Diagnostikum	CE	



Seramun Diagnostica GmbH • Spreehagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

 UDI Eindeutige Produktidentifizierung	 IVD In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	 SN Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	 REF Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	 LOT Chargennummer
 Ausreichend für <i>n</i> Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

Serazym® Anti-Francisella tularensis ist ein IVD-Test zur qualitativen Bestimmung von Antikörpern der IgG-, IgM- und IgA- Isotypen gegen das Lipopolysaccharid (LPS) aus *Francisella tularensis* in Serum humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Er dient der Diagnosehilfe von Tularämie in Proben von Patienten mit Verdacht auf eine Tularämie.

Der Test darf nicht verwendet werden mit anderen Probenmaterialien als Serum humanen Ursprungs, zu Diagnose, Überwachung, Screening, Vorhersage, Prognose, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung und durch Laienanwender.

Testprinzip

Serazym® Anti-Francisella tularensis ist ein Enzymimmunoassay, bei dem die verdünnten Serumproben, die zwei Positivkontrollen sowie die Negativkontrolle mit dem an der festen Phase adsorbierten Lipopolysaccharid (LPS) von *Francisella tularensis* reagieren. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C werden die ungebundenen Komponenten in einem Waschschrift entfernt. Im zweiten Inkubationsschritt binden die Peroxidase (HRP)-markierten anti-human IgG-/IgM-/IgA-Antikörper an die Probenantikörper. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C wird gebundenes Konjugat in einem Waschschrift entfernt. Die HRP setzt im folgenden 10-minütigen enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Reaktionsprodukt um. Diese Reaktion wird nach Inkubation durch Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit LPS von <i>Francisella tularensis</i>	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, farblos, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer K TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat, für 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent P TRIS-basierter Puffer	100 mL, gebrauchsfertig, orange-rot gefärbt, schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positivkontrolle Extinktion siehe Analysenzertifikat	0,5 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, rote Kappe
5	CONTROL w	Schwache Positivkontrolle Extinktion siehe Analysenzertifikat	0,5 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, weiße Kappe
6	CONTROL -	Negativkontrolle Extinktion siehe Analysenzertifikat	0,5 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, grüne Kappe
7	CONJ HRP	HRP-Konjugat HRP-markierte anti-human IgG-F(ab)2 (Ziege)-, anti-human IgM (Schaf)- und anti-human IgA (Schaf)-Antikörper	12 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, rote Kappe
8	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® fast2 < 0,1 % 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe

9	STOP	Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
10	COVER	Abdeckfolie	2 Stück
11		Analysenzertifikat	1 Stück
12		Gebrauchsanleitung	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen • Reagenzienbehälter für Mehrkanal-Mikropipetten • 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät • Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und 620 nm Referenzfilter • deionisiertes Wasser • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Waschpuffer (10x), Substrat und Stopplösung erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit Serazym® Anti-Francisella tularensis auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen.

Bei größeren Probenreihen empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers oder einer Wasserstrahlpumpe erfolgen.

Beim Waschvorgang dispensierten, verdünnten Waschpuffer mindestens 5 s einwirken lassen und Waschpufferreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren! Sollte das Substrat dunkel gefärbt sein oder Partikel aufweisen, darf dieses nicht mehr verwendet werden.

Sicherheitshinweise

Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

WELLS	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
DIL	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONTROL +	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
CONTROL w	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
CONTROL -	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ HRP	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
SUBSTR	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich
STOP	Gefahrbestimmende Komponenten	Schwefelsäure 2,5 %
	H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Grenzen der Methode

Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu inkorrekten Ergebnissen führen. Inkorrekt Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Proben und Testreagenzien sowie inkorrekte Zeiten bei der Inkubation der Proben und der Kontrollen können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

In bestimmten Fällen kann die Untersuchung einer weiteren, im Abstand von einigen Wochen entnommenen Serumprobe hilfreich sein.

Behandlung der Proben

Probennahme

Serum humanen Ursprungs in geeignetem Gefäß sammeln.

Probenthaltbarkeit und -lagerung

Serumproben humanen Ursprungs bis zu 2 Tage bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches (> 3 x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Vor der Verwendung die Proben auf Raumtemperatur erwärmen und durch kurzes Aufschütteln die Homogenität sichern.

Patientenproben mit Probenpuffer 1 : 51 (v/v) in einem Teströhrchen (zusätzlich benötigtes Hilfsmittel) verdünnen.

Beispiel: 10 µL Probe + 500 µL Probenpuffer.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar.

Reagenzienvorbereitung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschpuffer (10 x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10 x) + 90 mL deionisiertes Wasser.

Außer dem Waschpuffer sind alle enthaltenen Komponenten gebrauchsfertig.

Testdurchführung

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µL in die benötigte Anzahl an Kavitäten pipettieren.
3. Je 20 µL Positivkontrolle
20 µL schwache Positivkontrolle
20 µL Negativkontrolle
20 µl vorverdünnte Proben pipettieren, kurz schütteln.
4. Platte abdecken und 30 min bei 37 °C inkubieren.
5. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 100 µL HRP-Konjugat pro Kavität.
7. Platte abdecken und 15 min bei 37 °C inkubieren.
8. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
9. 100 µL Substrat pro Kavität.
10. 10 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren.
11. 100 µL Stopplösung pro Kavität, kurz schütteln.
12. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Auswertung der Ergebnisse

Cut-off Bestimmung

Der Cut-off beträgt 0,25 Extinktionseinheiten. Als Grauzone wird der Bereich von $0,8 \times \text{Cut-off}$ bis Cut-off definiert. Serumproben mit Extinktionen oberhalb des Cut-offs sind als reaktiv für anti-*Francisella tularensis*-Antikörper, Serumproben mit Extinktionen unterhalb der Grauzone als nicht reaktiv zu bewerten. Reaktive Serumproben sollten einem Bestätigungstest zugeführt werden. Bei einer Probe mit Extinktionen im Grauzonenbereich sollte eine weitere, im Abstand von 1-2 Wochen entnommene Serumprobe untersucht werden.

Interpretation der Ergebnisse

	Extinktion
Negativ	$< 0,20$
Positiv	$> 0,25$
Grauzone	$0,20 - 0,25$

Bei Proben mit Ergebnissen innerhalb der Grauzone sollte der Test wiederholt werden.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn

- Extinktion der Negativkontrolle $\leq 0,20$
- Extinktion der Positivkontrolle $\geq 1,50$

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Leistungsmerkmale

Sensitivität und Spezifität

Ein Panel von 402 Serumproben wurde mit dem Serazym® Anti-Francisella tularensis im Vergleich zu einem unabhängigen, kommerziell verfügbaren ELISA untersucht.

n = 402	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	89	1
Serazym® ELISA negativ	0	312

Sensitivität: 100,0 %

Spezifität: 99,7 %

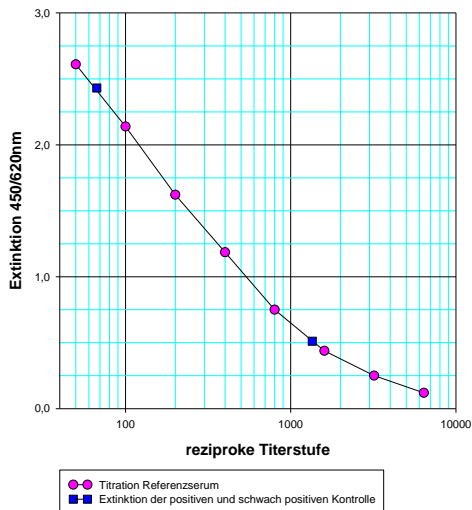
Präzision

Für die Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden die Proben in 12-facher Bestimmung in einem Testlauf vermessen.

Pool Antikörper positiver Seren (Titer der Vorverdünung)	\bar{x} OD	VK (%)
1:50	2,713	2,6
1:100	2,286	4,3
1:200	1,971	3,3
1:400	1,606	4,3
1:800	1,172	3,2
1:1600	0,800	4,5
1:3200	0,511	6,0
1:6400	0,334	8,6

Titrationkurve

Beispieltitration eines anti-*Francisella tularensis*-Antikörper positiven Serums im Serazym® Francisella tularensis ist nachfolgend dargestellt:




Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-12_v01_DE_EN	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen von Sicherheitshinweisen Aktualisierung Wichtige Hinweise












Serazym[®] Anti-Francisella tularensis

Enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgG, IgM, and IgA antibodies against lipopolysaccharide (LPS) of *Francisella tularensis* in serum of human origin

REF	E-049		96
IVD	In-vitro-diagnostic medical device	CE	



Seramun Diagnostica GmbH • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

<p>IVD In-vitro diagnostic medical device</p> <p> Country of manufacture and date of manufacture</p> <p> Keep away from sunlight</p> <p> Consult instructions for use</p> <p> Sufficient for <i>n</i> tests</p>	<p>UDI Unique device identifier</p> <p>REF Article number</p> <p> Humidity limitation</p> <p> Temperature limit</p> <p> Biohazard</p>	<p> Manufacturer</p> <p>SN Serial number</p> <p>LOT Batch code</p> <p> Do not reuse</p> <p> Use-by date</p> <p> Attention</p>
---	--	---

Intended Use

Serazym® Anti-*Francisella tularensis* is an IVD test for the qualitative determination of antibodies of the IgG, IgM and IgA isotypes against lipopolysaccharide (LPS) of *Francisella tularensis* in serum of human origin.

It is intended to aid in the diagnosis of tularemia in specimen materials from patients with suspicion of tularemia.

The test must not be used with specimen materials other than serum of human origin, for diagnosis, monitoring, screening, prediction, prognosis, as companion diagnostic, in the near patient setting and by lay persons.

Principle of the Test

Serazym® Anti-*Francisella tularensis* is an enzyme immunoassay in which the diluted serum samples, the two positive and the negative controls react with the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis* adsorbed to the solid phase. After a 30-minute incubation at 37 °C unbound components are removed by a wash step. In the second incubation step horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-human IgG/IgM/IgA antibodies bind to the sample antibodies. After a 15-minute incubation at 37 °C unbound conjugate is removed by a wash step. HRP converts the colorless substrate solution to a blue reaction product in the following 10-minute enzymatic reaction step. The reaction is stopped by addition of the stop solution, resulting in a color change from blue to yellow. The optical density (OD) of the reaction product measured at 450 nm measuring and ≥ 620 nm reference filter is directly proportional to the concentration of specifically bound antibodies.

Test Components (Delivery Scope)

			For 96 wells
1	WELLS	Microtiter plate coated with LPS of <i>Francisella tularensis</i>	12 single breakable 8-well strips, colorless, vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer K TRIS based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL solution, colorless, white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent P TRIS based buffer	100 mL, ready to use, colored orange/red, black cap
4	CONTROL +	Positive control Absorbance see Certificate of Analysis	0.5 mL, ready to use, colored blue, red cap
5	CONTROL w	Weak positive control Absorbance see Certificate of Analysis	0.5 mL, ready to use, colored blue, white cap
6	CONTROL -	Negative control Absorbance see Certificate of Analysis	0.5 mL, ready to use, colored blue, green cap
7	CONJ HRP	HRP conjugate HRP labeled anti-human IgG-F(ab)2 (goat), anti-human IgM (sheep), anti-human IgA antibodies (sheep)	12 mL, ready to use, colored green, red cap
8	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® fast2 < 0.1 % 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	15 mL, ready to use, colorless, blue cap

9	STOP	Stop solution SeramunBlau® stop 0.25 M sulphuric acid	15 mL, ready to use, colorless, yellow cap
10	COVER	Covering film	2 pieces
11		Certificate of Analysis	1 piece
12		Instructions for Use	1 piece

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micropipette • 8-channel pipette or multi-pipette with pipette tips • reagent container for multi-channel micro-pipettes • 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer • microplate reader with 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter • deionized water • measuring cylinder • tubes for sample preparation

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. Follow the instructions carefully. The kit may be performed by health professionals only.

Do not use reagents from damaged packages or bottles. The shelf life specified must be observed. Do not mix components with reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for wash buffer (10x), substrate and stop solution.

All serious incidents occurring in relation with Serazym® Anti-Francisella tularensis must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use.

For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multichannel pipette is recommended to avoid time delays. Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol.

The aspiration and washing steps can be performed manually or with the help of a microplate washer or waterjet pump. Wash solution should be allowed a minimum reaction time of 5 s in the wells per wash cycle. Remove wash buffer residues by thoroughly aspirating or tapping out the cavities!

Protect substrate from light! The test should not be performed with a substrate solution that is colored dark or contains colored precipitates.

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Some reagents may contain biocides as preservative. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

WELLS	-	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
DIL	-	Contains material of animal origin.
CONTROL +	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
CONTROL w	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
CONTROL -	-	Contains material of animal origin.
CONJ HRP	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
SUBSTR	EUH210	Safety data sheet available on request.
STOP	Hazard components H290	Sulphuric acid 2.5 % May be corrosive to metals.

Limitations of the Procedure

Contamination of reagents and samples by bacteria or fungi as well as cross-contamination of the test kit reagents and samples can lead to incorrect results. Incorrect washing to separate unbound components from the sample and test reagents as well as incorrect incubation times of the samples and controls can cause incorrect results as well.

The overall interpretation of an ELISA test result should consider all clinical findings.

In certain cases testing of another serum sample taken at intervals of a few weeks may be helpful.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect serum of human origin in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 2 days. For longer periods samples have to be stored at -20 °C. Repeated (> 3 x) freezing and thawing of samples should be avoided.

Sample Preparation

Bring samples to room temperature before use. Homogeneity should be ensured by shaking components briefly. Samples have to be diluted 1 : 51 (v/v) with sample diluent.

Example: 10 µL sample and 500 µL sample diluent.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtitration strips can be stored at 2...8 °C until the printed expiration date. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

Reagent Preparation

The microtiter plate with breakable 8-well strips is vacuum sealed with desiccant. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored at 2...8 °C and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Dilute wash buffer (10 x) 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10 x) + 90 mL deionized water.

Except for the wash buffer all components included in the test kit are ready to use.

Assay Procedure

1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. Pipette 100 µL **DIL** into the required number of cavities.
3. Pipette 20 µL **CONTROL +** Positive control
20 µL **CONTROL w** Weak positive control
20 µL **CONTROL -** Negative control
20 µL diluted sample each, mix gently.
4. Cover the plate and incubate for 30 min at 37 °C.
5. Decant, then wash each well 5 x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. 100 µL **CONJ HRP** HRP conjugate per cavity.
7. Cover the plate and incubate for 15 min at 37 °C.
8. Decant, then wash each well 5 x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
9. 100 µL **SUBSTR** substrate per cavity.
10. Incubate for 10 min at RT **protected from light**.
11. 100 µL **STOP** stop solution per cavity, mix gently.
12. Read OD at 450 nm and ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min following reaction stop.

Evaluation of Results

Determination of Cut-off

The cut-off is 0.25 absorbance units. The gray zone is defined as the range between 0.8 x cut-off and cut-off value. Serum samples with absorbances above cut-off value are considered reactive for anti-*Francisella tularensis* antibodies, serum samples with absorbances below the gray zone are considered non-reactive. Reactive serum samples should be verified in a second test. A sample with absorbance values in the gray zone should be re-tested with a new serum sample collected at an interval of 1 - 2 weeks.

Interpretation of Results

Positive	< 0.20
Negative	> 0.25
Gray zone	0.20 – 0.25

For samples with results within the gray zone, the test should be repeated.

Test Validation

The test run is valid if

- absorbance of negative control ≤ 0.20
- absorbance of positive control ≥ 1.50

If the above-mentioned quality criteria are not met, the test should be repeated strictly following the test procedure (reagent preparation, incubation times and temperatures, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact the manufacturer.

Performance Characteristics

Sensitivity and Specificity

A panel of 402 serum samples was tested with Serazym® Anti-Francisella tularensis in comparison to an independent, commercially available ELISA.

n = 402	ELISA positive	ELISA negative
Serazym® ELISA positive	89	1
Serazym® ELISA negative	0	312

Sensitivity: 100,0 %

Specificity: 99.7 %

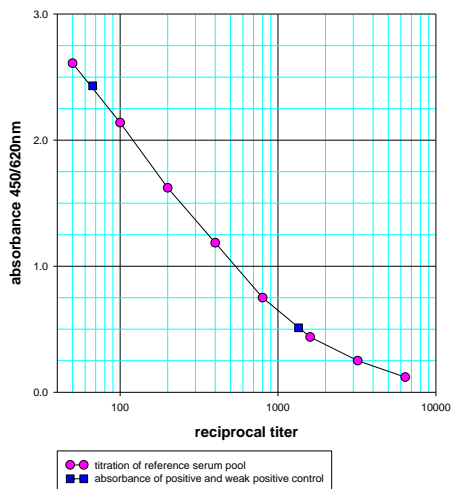
Precision

For the determination of the intra-assay-coefficient of variation (CV) samples were measured in a 12-fold determination in one test run.

Pool of antibody positive sera (titer of predilution)	\bar{x} OD	CV (%)
1:50	2.713	2.6
1:100	2.286	4.3
1:200	1.971	3.3
1:400	1.606	4.3
1:800	1.172	3.2
1:1600	0.800	4.5
1:3200	0.511	6.0
1:6400	0.334	8.6

Titration Curve

Titration curve of a pooled anti-*Francisella tularensis* reactive serum sample in Serazym® Anti-*Francisella tularensis* is shown below:



Change History

Version	Section	Modifications
2022-12_v01_DE_EN	Entire document	Updating of the Intended Use Conversion of subsections Insertion of Safety Instructions Updating Important information

References

1. Büyüç, F et al. (2016): "The prevalence of tularemia in occupational groups that have contact with animals". Turk J Med Sci, Vol. 46, p. 451-456.
2. Chaignat, V et al. (2014): "Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia". BMC Infectious Diseases, vol. 14: 234.
3. Erdem, H et al. (2014): "Evaluation of tularaemia courses: a multicentre study from Turkey". Clin Microbiol Infect, vol. 20, p. 1042-1051.
4. Njeru, J et al. (2017): "Serological evidence of Francisella tularensis in febrile patients seeking treatment at remote hospitals, northeastern Kenya, 2014–2015". New Microbe and New Infect, vol. 19, p. 62–66.
5. Robert Koch Institut (2016): "Tularämie". Epidemiologisches Bulletin Nr. 12
6. Schmitt, P et al (2004): "A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia". Epidemiol. Infect., vol. 133, p. 759–766.
7. Yanes, H et al. (2017): "Evaluation of In-House and Commercial Serological Tests for Diagnosis of Human Tularemia". J Clin Microbiol, vol. 56:1.