



Spreenhagener Str. 1
15754 Heidesee OT Wolzig, Germany

Telefon: +49-33767 – 791-10
Fax: +49-33767 – 791-99
seramun@t-online.de
www.seramun.com

Produkt- und Gebrauchsinformation

Serazym[®] Anti-Francisella tularensis

REF E-049
Σ 96



IVD

In-vitro-Diagnostikum

Enzymimmunoassay zum Nachweis von
IgG, IgA und IgM Antikörpern gegen
Francisella tularensis in Humanserum

REF	Bestell-Nr.	LOT	Chargen-Nr.
	Lagertemperatur		Hersteller
	Hinweise beachten		Verfallsdatum
	Arbeitsanleitung beachten		Anzahl Bestimmungen
			Biologische Gefahr

Einführung

Francisella tularensis ist der Erreger der Tularämie, einer pestähnlichen Infektionskrankheit (Hasenpest), die von Tieren (vor allem Nagern) direkt oder durch deren Ektoparasiten sowie durch kontaminierte Nahrungsmittel (auch Wasser und Aerosole) auf den Menschen übertragen wird. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5 Tagen beginnt die Krankheit mit uncharakteristischen Allgemeinsymptomen wie starken Kopf- und Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit und Fieber. Klinisch lassen sich die ulzeroglanduläre Verlaufsform (Primäraffekt, Lymphknotenschwellungen) und die okulo-glanduläre Form (Konjunktivitis) von der inneren Form der Tularämie abgrenzen. Die pulmonale Verlaufsform ist durch Lungen- und Brustfellentzündungen geprägt. Eine abdominale (typhöse) Verlaufsform geht mit Diarrhoe, Milzschwellungen und intermittierenden Fieberschüben einher.

Der Erregernachweis erfolgt mikroskopisch nach Kultivierung und mittels Immunfluoreszenz. Der Nachweis der ab der 2. Krankheitswoche gebildeten spezifischen Antikörper im Serum gewinnt zunehmende Bedeutung bei der Diagnostik der Tularämie in der labordiagnostischen Praxis (indirekter Hämagglutinationstest, Komplementbindungsreaktion, Enzymimmunoassay). Krankheitsverdacht, Erkrankung oder Tod an Tularämie sind in Deutschland meldepflichtig.

Anwendungsbereich

Der **Serazym[®] Anti-Francisella tularensis** ist ein in vitro Diagnostikum zum Nachweis von Antikörpern der Immunglobulin-klassen IgG, IgA und IgM gegen das Lipopolysaccharid (LPS) von *Francisella tularensis* in Humanserum.

Testprinzip

Der **Serazym[®] Anti-Francisella tularensis** ist ein immunenzymometrischer Zwei-Schritt Assay. Proben und Kontrollen werden in die mit Lipopolysaccharid von *Francisella tularensis* beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C werden die ungebundenen Komponenten aus den Vertiefungen abgesaugt und die Vertiefungen fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von anti-Human-IgG-/anti-Human-IgA-/anti-Human-IgM-POD-Konjugat wird 15 min bei 37 °C inkubiert und nach dem Absaugen fünfmal gewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit Substrat (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) für die enzymatische Reaktion gefüllt. Nach 10 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur erfolgt der Reaktionsstopp durch Zugabe von Schwefelsäure in die Vertiefungen. Blaugefärbte Produktlösungen verfärben sich dadurch gelb. Die Extinktion der gelben Lösungen wird durch Vertikalphotometrie bei 450 nm Wellenlänge oder besser durch Subtraktionswellenlängenmessung 450 nm minus 620 nm Extinktion bestimmt. Die Auswertung erfolgt unter Bezug auf die Extinktionen der mitgeführten Kontrollproben.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum, Plasma oder andere biologische Flüssigkeiten können im *Serazym*[®] Anti-Francisella tularensis auf anti-F. tularensis IgG-, IgA- und IgM-Antikörper untersucht werden.

Serum- oder Plasma-Proben 1:51 mit Probenverdünnungsmedium verdünnen, z.B. 10 µl Probe + 500 µl Verdünnungsmedium (3).

Auf eine sterile Probengewinnung ist zu achten. Proben können bei 2...8 °C bis zu 48 h gelagert werden. Bei längerer Lagerung empfiehlt es sich, die Proben bei – 20 °C einzufrieren. Gerorene Proben vor Testansatz zügig auftauen und gründlich mischen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Testbesteckbestandteile

1 WELLS	Mikrotitrationsplatte 12 einzeln brechbare 8-well strips (insgesamt 96 wells) beschichtet mit gereinigtem LPS von <i>Francisella tularensis</i>	1 vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2 WASHBUF CONC 10X	Waschpuffer, 10-fach für 1000 ml Waschlösung	100 ml Konzentrat, Weiße Kappe
3 DIL	Verdünnungsmedium	100 ml gebrauchsfertig, schwarze Kappe rot gefärbt
4 CONTROL +	positive Kontrolle	0,5 ml gebrauchsfertig, rote Kappe blau gefärbt
5 CONTROL WEAK +	schwach positive Kontrolle	0,5 ml gebrauchsfertig, weiße Kappe blau gefärbt
6 CONTROL -	negative Kontrolle	0,5 ml gebrauchsfertig, grüne Kappe blau gefärbt
7 CONJ HRP	Konjugat POD-markierte, polyklonale anti-human-IgG/IgA/IgM Antikörper (Schaf)	12 ml gebrauchsfertig, rote Kappe
8 SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml gebrauchsfertig, blaue Kappe
9 STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml gebrauchsfertige gelbe Kappe

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Mikropipetten
- Mehrkanal-Pipetten oder Multipipetten
- Reagenzienreservoir für Mehrkanalpipette
- Achtkanal-Waschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehälter oder Mikrotiterplatten-Wascher
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Mess- und \geq 620 nm Referenzfilter
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Messzylinder, Bechergläser
- Teströhrchen (2 ml) für die Probenvorbereitung

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 2 Monate haltbar.

Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei 2...8 °C mindestens 1 Monat haltbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Strips 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.

WASHBUF CONC 10X (2) 1:10 (1+9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel:

10 ml **WASHBUF CONC 10X (2)** + 90 ml destilliertes Wasser.

Testdurchführung

- **Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 + 50 (v/v) verdünnen, z.B. 10 µl Serum + 0,5 ml Verdünnungsmedium (3)**
- **Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten!**
- **Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette um Zeitverzögerungen zu vermeiden.**
- **Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen.**
- **Substrat vor Licht geschützt aufbewahren.**

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf RT erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
2. **100 µl DIL** (gebrauchsfertiges Probenverdünnungsmedium) (3) in alle Kavitäten pipettieren
3. **20 µl** vorverdünnte Proben, **20 µl CONTROL +** (positive Kontrolle (4)), **20 µl CONTROL WEAK +** (schwach positive Kontrolle (5)), bzw. **20 µl CONTROL -** (negative Kontrolle(6))
In die vorgesehenen Kavitäten pipettieren und gründlich mischen.
4. Platte abkleben und für **30 Minuten** bei **37°C** inkubieren.
5. Dekantieren und **5x** with **300 µl** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen.
6. **100 µl CONJ HRP (7)** pipettieren.
7. Platte abkleben und für **15 Minuten** bei **37°C** inkubieren.
8. Dekantieren und **5x** with **300 µl** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen.
9. **100 µl SUBSTR TMB (8)** pipettieren.
10. **10 min** bei RT lichtgeschützt inkubieren.
11. **100 µl STOP (9)** pipettieren und kurz schütteln.
12. Messen der Extinktionen bei **450 nm / \geq 620 nm** innerhalb von 30 Minuten.

Auswertung

Grenzwert und Grauzone

Die Grenzwertextinktion beträgt 0,25 Extinktionseinheiten. Als „Grau“-Zone wird der Bereich von 0,8 x Grenzwert-Extinktion bis Grenzwert-Extinktion definiert. Serumproben mit Antikörperkonzentrationen oberhalb der Grenzwert-Extinktion sind als reaktiv für *Anti-Francisella tularensis* Antikörper, Serumproben mit Antikörperkonzentrationen unterhalb der Extinktion der „Grau“-Zone als nicht reaktiv zu bewerten. Reaktive Serumproben sollten einem Bestätigungstest zugeführt werden. Bei Proben mit Extinktionen im „Grau“-Zonenbereich sollte eine weitere, im Abstand von 1-2 Wochen entnommene Serumprobe untersucht werden.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- die Extinktion der negativen-Kontrolle und $\leq 0,20$
- die Extinktion der positiven-Kontrolle bestimmt wird. $\geq 1,50$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Probenvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Referenzwerte

Serazym® Anti-Francisella tularensis	Extinktion
Negativ	< 0,20
Positiv	> 0,25
Grauzone	0,20 – 0,25

Grenzen der Methode

Wie bei allen (enzym)immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Inkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Inkubation der Proben und der Kontrollen können zu falschen Ergebnissen führen.

Die Ergebnisinterpretation sollte immer klinische Befunde mit einbeziehen. In bestimmten Fällen kann die Untersuchung einer weiteren, im Abstand von einigen Wochen entnommenen Serumprobe hilfreich sein.

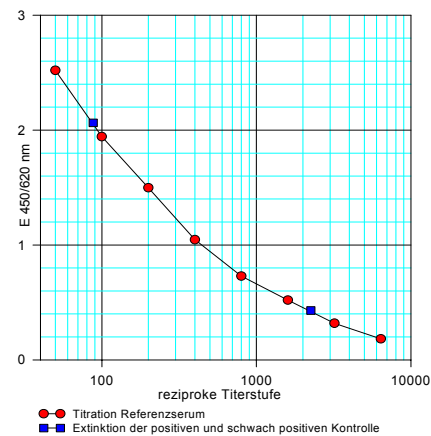
Testcharakteristika

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten:

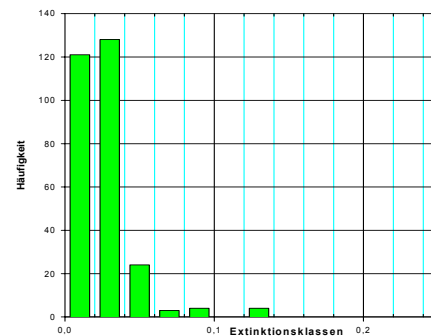
Pool Antikörper positive Seren (Titer der externen Vorverdünnung)	Mittelwert Extinktion	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%)
1:50	2,713	0,071	2,62
1:100	2,286	0,099	4,32
1:200	1,971	0,065	3,29
1:400	1,606	0,070	4,33
1:800	1,172	0,037	3,19
1:1600	0,800	0,036	4,46
1:3200	0,511	0,030	5,97
1:6400	0,334	0,029	8,61

Beispiel der Titration eines anti-F. tularensis Antikörper positiven Serums



Häufigkeitsverteilung

Histogramm anti-F.tularensis negative Seren (n = 286 Einzelbestimmungen).



Klinische Validierung

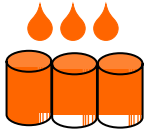
Ein Panel von 402 Serumproben wurde mit dem anti-Francisella tularensis Antikörper ELISA des deutschen Referenzlabors (InstMikroBio San Ak Bw) und mit dem Serazym® Anti-Francisella tularensis untersucht

		Anti-Francisella tularensis ELISA Referenzlabor	
		-	+
Serazym® Anti-Francisella tularensis	-	312	0
	+	1	89

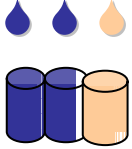
Sensitivität: 100 %
Spezifität: 99.7 %

Inkubationsschema

Serazym[®] Anti-Francisella tularensis

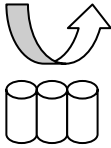


100 µl **DIL (3)** in alle Kavitäten



20 µl **CONTROL + (4)**
20 µl **CONTROL WEAK + (5)**
20 µl **CONTROL - (6)**
20 µl **verdünnte Serumprobe (1:51)**

30 min Inkubation bei 37 °C

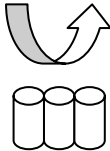


5 X Waschen mit Waschlösung

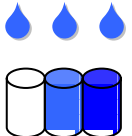


100 µl **CONJ HRP (7)**

15 min Inkubation bei 37 °C

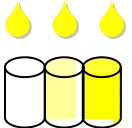


5 X Waschen mit Waschlösung



100 µl **SUBSTR TMB (8)**

10 min Inkubation bei Raumtemperatur, lichtgeschützt



100 µl **STOP (9)**

Messung der Extinktionen bei 450/≥620 nm

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.

Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen und die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks ist nicht erlaubt.

Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/v) und Thimerosal (0,01 % w/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten. Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- Nicht essen, trinken oder rauchen!
- Nie mit dem Mund pipettieren!
- Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!
- Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!