

Serablot[®] Anti-Francisella tularensis IgG

Immunoblot zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen *Francisella tularensis*
in humanem Serum oder Plasma

REF WB-003 G  27  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

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 ulzero-glanduläre 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. Krankheitsverdacht, Erkrankung oder Tod an Tularämie sind in Deutschland meldepflichtig.

Anwendungsbereich

Der *Serablot*[®] Anti-*Francisella tularensis* IgG ist ein empfindlicher Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern der Immunglobulinklasse IgG gegen das Lipopolysaccharid (LPS) von *Francisella tularensis* in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Gereinigte Lipopolysaccharide von *Francisella tularensis* werden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1:201 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um.

Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe erscheinen als charakteristisches „Strickleiternmuster“ aufgrund des unterschiedlichen Glykosilierungsgrades von Lipid A.

Die Auswertung erfolgt nach Trocknen der Teststreifen durch Vergleich des Bandenmusters mit dem auf der mitgelieferten Auswerteschablone.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 201 (10 µl Probe und 2000 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

Testkomponenten

1	TESTSTR	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	27 Streifen
2	WIB CONG 5x	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	100 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-POD- Konjugat	55 ml gebrauchsfertig, IgG , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe
4	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	55 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	INCUTRAY	Inkubationswanne mit Deckel	2

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 10 µl und 2000 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 27 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **2 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **10 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **2 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **2 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **2 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **2 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **2 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Kontrollbande direkt unter der aufgedruckten Blotstreifennummer angezeigt wird.



Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Serologisch Positiv:

Wenn regelmäßig angeordnete Banden ein „Strickleitermuster“ ergeben. Ein solches „Strickleitermuster“ von einer Positivkontrolle ist auf der Auswerteschablone abgebildet.

Serologisch Negativ:

Wenn keine oder nur wenige Banden zu erkennen sind, die jedoch kein regelmäßig angeordnetes Bandenmuster ergeben.

Leistungsmerkmale

Sensitivität

In einer vergleichende Studie (Referenzlabor) wurden 186 charakterisierte Seren im *Serazym*[®] Anti-Francisella tularensis IgG + IgM + IgA Antikörper ELISA und im *Serablot*[®] Anti-Francisella tularensis IgG untersucht.

n = 186 Proben		<i>Serablot</i> [®] Anti-Francisella tularensis IgG	
		positiv	negativ
<i>Serazym</i> [®] Anti-F. tularensis IgG+IgM+IgA	positiv	114	6
	negativ	3	63

Sensitivität: 95,2%

Spezifität

Ein Kollektiv von 100 Blutspenderseren wurde zur Ermittlung der Spezifität im *Serablot*[®] Anti-Francisella tularensis IgG untersucht. Von diesen Proben wurden 5 positiv bestimmt.

Spezifität: 95,0%

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

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. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. 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 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!**



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung



Hersteller



Bestell-Nummer



Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum






Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Serablot[®] Anti-*Francisella tularensis* IgG

Immunoblot for detection of IgG antibodies to *Francisella tularensis*
in human serum or plasma

REF WB-003 G  27  *In-vitro*-Diagnostic device 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Francisella tularensis is the causative agent of the zoonotic disease tularaemia (deer fly fever) in humans and animals. Additionally to transmission via infected animals especially rodents or their ectoparasites the disease can be transmitted via contaminated water or food and aerosols. After 3 to 5 days lasting incubation period the onset of disease is rather uncharacteristic with symptoms like headache, fatigue and fever. The various clinical manifestations as ulceroglandular, pulmonary or typhoidal form depend on the site of bacterial entry. The pulmonary course of infection is characterized by pneumonia and pleuritis and the abdominal course of infection by severe diarrhea, splenomegaly and intermittent fever.

Francisella tularensis can be identified directly by immunofluorescence microscopy or agglutination assays after isolation from affected tissue (e.g. lymph nodes) and subsequent cultivation. This procedure however is time consuming and detection of specific antibodies induced in the infected individuals e.g. by ELISA techniques gain significance. A positive ELISA result should be confirmed by a different second method which normally is an immunoblot. By that reason an immunoblot procedure was developed to confirm or to rule out antibodies to *Francisella tularensis* as reason for a positive ELISA result.

Intended use

The *Serablot*[®] Anti-*Francisella tularensis* IgG is an Immunoblot for detection of IgG antibodies directed to the lipopolysaccharide of the gram negative bacterium *Francisella tularensis* in human serum or plasma samples.

Principle of the test

Highly purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* is separated by SDS-PAGE and subsequently transferred to nitrocellulose membrane. After blocking of remaining binding sites the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 201) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates.

The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template.

Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 201 (10 µl sample and 2000 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Kit components

1	TESTSTR	test strips incl. evaluation template	27 strips
2	WIB CONC 5x	wash and incubation buffer 5-fold	100 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	CONJ HRP IgG	anti-human IgG-HRP-conjugate	55 ml , ready to use, IgG , coloured red, transparent bottle, red cap
4	SUBSTR TMB	substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	55 ml , ready to use, black bottle, blue cap
5	INCUTRAY	incubation tray with cover	2

Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 10 µl and 2000 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 27 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

Working steps

1. Incubate the test strips with **2 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **10 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **2 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **2 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **2 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **2 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **2 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

Test evaluation

Test validity

The internal control band on the top of the teststrip must be present with a strong colour. Absence or very low colour intensity indicate an incorrect test procedure.



Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips.

To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet.

Positive:

Visible image of a regular band pattern with systematically growing (see evaluation template provided with the kit).

Negative:

No or only a few bands without the characteristic regular band pattern.

Performance characteristics

Sensitivity

Results from the comparative investigation of serum samples (n = 186) that had been characterized by the German reference laboratory using *Serablot*[®] Anti- Francisella tularensis IgG and *Serazym*[®] Anti-Francisella tularensis IgG + IgM + IgA.

n = 186 samples		<i>Serablot</i> [®] Anti-Francisella tularensis IgG	
		positive	negative
<i>Serazym</i> [®] Anti-F. tularensis IgG+IgM+IgA	positive	114	6
	negative	3	63

Sensitivity: 95.2%

Specificity

A population of 100 healthy blood donors was investigated to determine the specificity of *Serablot*[®] Anti-Francisella tularensis IgG. Out of this population 5 serum samples were determined positive.

Specificity: 95.0%

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use