

Serazym[®] Ovalbumin

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ovalbumin
in biologischen Flüssigkeiten

REF E-041a-1 ▽96

In vitro Test



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

Anwendungsbereich

Serazym[®] Ovalbumin ist ein Enzymimmunoassay für die sensitive, quantitative Bestimmung von Ovalbumin in biologischen Flüssigkeiten.

Testprinzip

Serazym[®] Ovalbumin ist ein schneller Ein-Schritt-Enzymimmunoassay basierend auf polyklonalen Antikörpern vom Kaninchen, die gegen Ovalbumin gerichtet sind.

Im ersten Schritt werden Probenmaterial und Peroxidase-(POD)-markierte anti-Ovalbumin-Antikörper simultan in die mit anti-Ovalbumin-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C werden die ungebundenen Komponenten durch Absaugen und einen anschließenden Waschprozess entfernt.

Im zweiten Schritt setzt die Peroxidase in einem 10-minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur (20...25 °C) die zugesetzte farblose Substratlösung mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt um. Der Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von Schwefelsäure in die Vertiefungen, wodurch ein Farbumschlag von blau zu gelb stattfindet.

Die bei 450/≥620 nm gemessene Extinktion (OD) des Endprodukts ist der Konzentration des spezifisch gebundenen Ovalbumins direkt proportional. Anhand der gemessenen Extinktionen der Standards und deren entsprechenden Ovalbumin-Konzentrationen wird eine Standardkurve erstellt, an der die Konzentrationen der unbekanntenen Proben abgelesen werden können.

Testkomponenten

| | | Für 96 Kavitäten | |
|---|-------------------------|--|--|
| 1 | WELLS | Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-Ovalbumin-Antikörpern (Kaninchen) | 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten vakuumversiegelt mit Trockenbeutel |
| 2 | WASHBUF CONC 10x | Waschpuffer Seramun® Wash buffer D 10-fach | 50 ml Konzentrat für 500 ml Lösung weiße Kappe |
| 3 | DIL | Verdünnungsmedium Seramun® Sample diluent C | 50 ml gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe |
| 4 | STD 1-7 | Standard 1 – 7 STD1 = 20,0 ng/ml STD2 = 10,0 ng/ml STD3 = 5,0 ng/ml STD4 = 2,5 ng/ml STD5 = 1,25 ng/ml STD6 = 0,625 ng/ml STD7 = 0,313 ng/ml | 1,0 ml pro Standard gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Kappe |
| 5 | CONTROL | Kontrolle 7,5 ng/ml | 1,0 ml gebrauchsfertig rot gefärbt grüne Kappe |
| 6 | CONJ HRP | POD-Konjugat POD markierte, polyklonale anti-Ovalbumin-Antikörper (Kaninchen) in Stabilisierungs-Lösung | 15 ml gebrauchsfertig grün gefärbt rote Kappe |
| 7 | SUBSTR TMB | Substrat SeramunBlau® automat fast 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid | 15 ml gebrauchsfertig blaue Kappe |
| 8 | STOP | Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure | 15 ml gebrauchsfertig gelbe Kappe |
| 9 | COVER | Abdeckfolie | 1x |

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Serazym® Ovalbumin wird verwendet, um den Ovalbumingehalt in verdünnten biologischen Flüssigkeiten zu bestimmen. Proben sollten nicht länger als 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Für längere Lagerung wird eine Temperatur von -20 °C empfohlen. Eingefrorene Proben sollten vor dem Verwenden zügig auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Vorbereitung und Verwendung

Proben müssen üblicherweise zwischen 1:11 und 1:101 mit Verdünnungsmedium verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist abhängig vom Probenmaterial und der erwarteten Ovalbumin-Konzentration.

1000 µl Verdünnungsmedium in ein sauberes Röhrchen pipettieren und 100 µl (1:11) oder 10 µl (1:101) der Probe hinzufügen. Gründlich mischen.

Zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette 0,100 – 1,000 ml und 0,010 – 0,100 ml · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten 0.050 - 0.200 ml · Pipettenspitzen · Reagenzbehälter zur Dispensierung mit 8-Kanalpipette · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder und Bechergläser · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · Stoppuhr · Inkubator (37°C)

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck E-041a-1 (1x 96 Kavitäten) erlaubt die sensitive, quantitative Ovalbumin-Bestimmung in maximal 40 Proben, wenn diese sowie die Standards und Kontrolle als Doppelbestimmung eingesetzt werden.

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

Vorbereitung und Verwendung

Alle Reagenzien müssen Raumtemperatur erreicht haben, bevor sie im Assay verwendet werden dürfen. Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten 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. Beutel fest verschließen und kühl lagern.

Verdünnungsmedium

Das Verdünnungsmedium ist gebrauchsfertig. Bei einer Lagerung bei 2...8 °C können Präzipitate auftreten, die nach Erreichen der Raumtemperatur wieder in Lösung gehen. Das Verdünnungsmedium erst verwenden, wenn es Raumtemperatur erreicht hat.

Waschpuffer

Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser

Außer dem Waschpuffer sind alle enthaltenen Komponenten gebrauchsfertig.

Testdurchführung

Proben mit Verdünnungsmedium (3) verdünnen (üblicherweise zwischen 1:11 und 1:101).

Achtung: Aufgrund des in Ein-Schritt-Assays auftretenden High-Dose-Hook-Effektes können sehr hohe Ovalbumin-Konzentrationen falsch zu niedrig bestimmt werden. Aus diesem Grund ist es ratsam, Proben in zwei Verdünnungsstufen, die sich wenigstens um Faktor 10 unterscheiden, im Test einzusetzen.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten. Die Standards und die Kontrolle sind gebrauchsfertig. Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden

Für den Fall, dass ein Waschgerät verwendet wird, ist sicherzustellen, dass die Kavitäten komplett gefüllt (mindestens 300 μ l/Kavität) und nach jedem Waschzyklus komplett entleert werden. Für den Fall, dass per Hand gewaschen wird, sind Schaumbildung und Luftblasen in den Kavitäten zu vermeiden. Die Einwirkzeit des Waschpuffers in den Kavitäten muss mindestens 5 Sekunden pro Waschzyklus betragen. Die Flüssigkeit muss nach jedem Waschzyklus komplett entfernt werden.

Es wird empfohlen, Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten zu entfernen.

Substrat (7) vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden
2. 100 µl **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität pipettieren
3. je 100 µl **verdünnte Probe**
 - 100 µl **STD 1 – 7** Standard 1-7 (4)
 - 100 µl **CONTROL** Kontrolle (5)in die dafür vorgesehenen Kavitäten pipettieren, vorsichtig mischen.
Es wird empfohlen, Proben, Standards und Kontrolle in Doppelbestimmung zu untersuchen.
4. Platte abdecken **COVER** (9) und für 60 min bei 37 °C inkubieren.
5. Dekantieren und 5-mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 100 µl **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität pipettieren.
7. 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.
8. 100 µl **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität pipettieren, vorsichtig mischen.
9. Messen der OD bei 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min nach Reaktionsstopp.

Berechnung der Ergebnisse

Durch Auftragen der gemessenen Mittelwerte der Extinktion der Standards 1 – 7 (y-Achse) gegen die deklarierte Ovalbumin-Konzentration (x-Achse) wird eine Standardkurve erstellt.

Zur Erstellung der Standardkurve wird das 4-Parameter-Regressionsmodell empfohlen.

Die Ovalbumin-Konzentration der unbekanntenen Probe wird durch Ablesen der Extinktion an der Standardkurve bestimmt. Proben mit höheren Ovalbumin-Konzentrationen als Standard 1 (20 ng/ml) sollten in einer höheren Verdünnung nochmals getestet werden. Im Falle einer Vorverdünnung der Proben ist die erhaltene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Referenzwerte

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- der Extinktionsmittelwert von Standard 1 (20,0 ng/ml) $\geq 1,50$
- der Extinktionsmittelwert von Standard 7 (0,313 ng/ml) $\leq 0,50$
- der Mittelwert der Kontrolle zwischen 5,0 ng/ml und 10,0 ng/ml bestimmt wird.

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

Grenzen der Methode

Falsche Ergebnisse können durch Kontaminationen der Reagenzien oder der Arbeitsgeräte hervorgerufen werden. Kreuzreaktionen der Reagenzien oder Proben, bakterielle oder Pilzkontaminationen der Reagenzien oder der Proben, inkorrektes Waschen und inkorrekte Inkubationszeiten können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Kreuzreaktivität

Albumine, aus folgenden Spezies, zeigten bei Untersuchung im *Serazym*[®] Ovalbumin keine Kreuzreaktivität:

Human Serum Albumin (HSA), Bovine Serum Albumin (BSA), Maus Serum Albumin, Schaf Serum Albumin, Kaninchen Serum Albumin

Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*[®] Ovalbumin aus 12-fach Bestimmungen der Proben.

| Probe | Extinktionsmittelwert | Standardabweichung | VK [%] |
|-------|-----------------------|--------------------|--------|
| 1 | 2,508 | 0,081 | 3,23 |
| 2 | 1,937 | 0,039 | 2,00 |
| 3 | 1,573 | 0,066 | 4,20 |
| 4 | 1,135 | 0,042 | 3,74 |
| 5 | 0,645 | 0,025 | 3,83 |
| 6 | 0,281 | 0,013 | 4,48 |

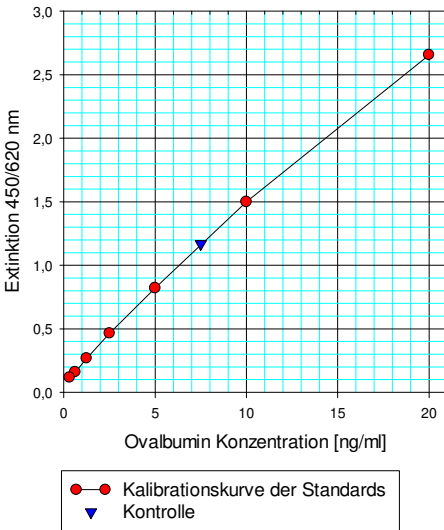
| Probe | Konzentrationsmittelwert [ng/ml] | Standardabweichung | VK [%] |
|-------|----------------------------------|--------------------|--------|
| 1 | 5,07 | 0,23 | 4,54 |
| 2 | 4,09 | 0,31 | 7,58 |
| 3 | 3,28 | 0,26 | 7,93 |
| 4 | 2,18 | 0,06 | 2,75 |
| 5 | 1,59 | 0,07 | 4,28 |
| 6 | 0,78 | 0,03 | 3,59 |

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*[®] Ovalbumin in 24 unterschiedlichen Ansätzen.

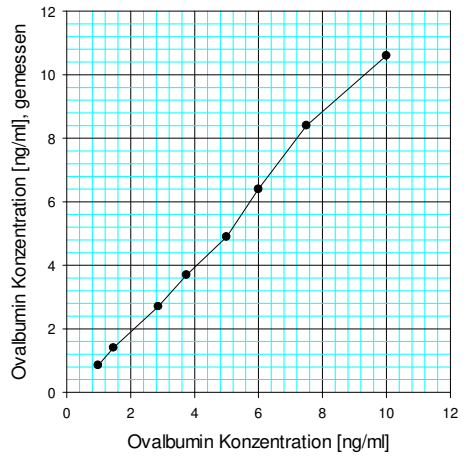
| Probe | Extinktionsmittelwert | Standardabweichung | VK [%] |
|-------|-----------------------|--------------------|--------|
| 1 | 2,326 | 0,141 | 6,06 |
| 2 | 1,750 | 0,069 | 3,94 |
| 3 | 1,078 | 0,053 | 4,92 |
| 4 | 0,407 | 0,031 | 7,62 |

| Probe | Konzentrationsmittelwert [ng/ml] | Standardabweichung | VK [%] |
|-------|----------------------------------|--------------------|--------|
| 1 | 8,83 | 0,73 | 8,27 |
| 2 | 4,55 | 0,29 | 6,37 |
| 3 | 3,04 | 0,21 | 6,91 |
| 4 | 0,82 | 0,05 | 6,10 |

Typische Kalibrationskurve im Serazym® Ovalbumin

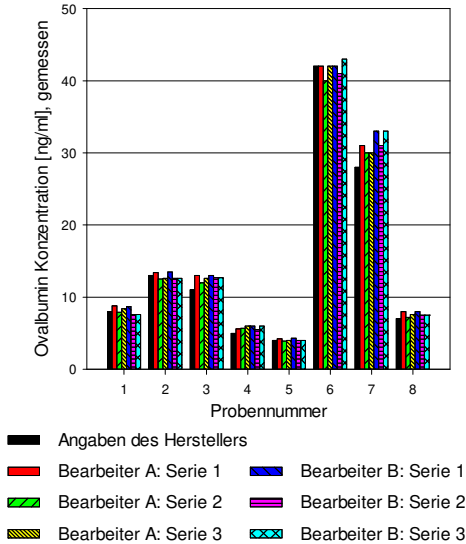


Verdünnungslinearität



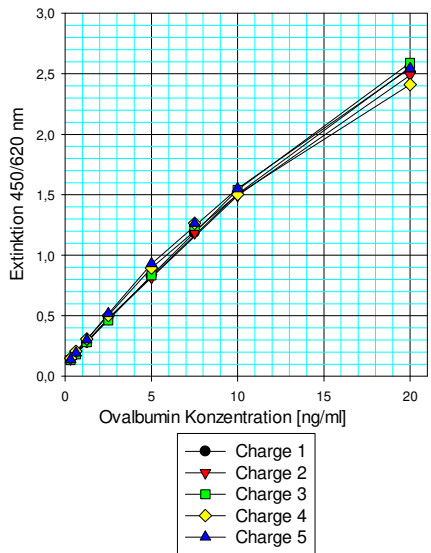
Ovalbuminkonzentration in Vakzinen

Quantifizierung von Proben in unterschiedlichen Serien durch verschiedene Bearbeiter



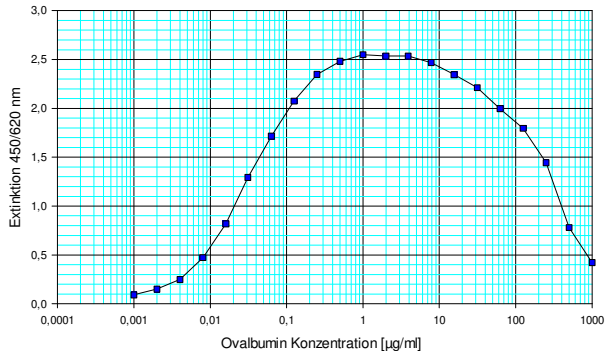
Chargen Übereinstimmung

Standardkurve von 5 verschiedenen Chargen



High-Dose-Hook-Effekt

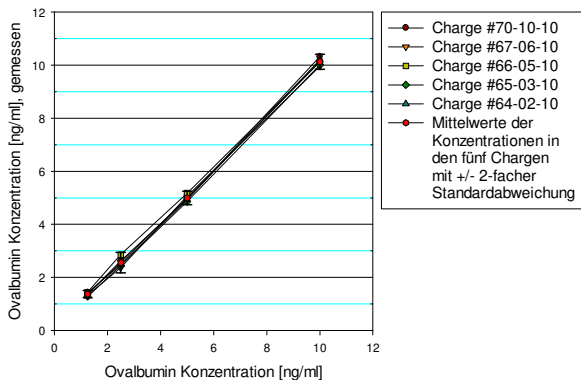
Zur Ermittlung des bei Ein-Schritt-Assays (simultane Inkubation von Probe und Konjugat) auftretenden High-Dose-Hook-Effektes wurden Konzentrationen von 0,001 – 1.000 µg/ml bestimmt. Um den Messbereich des Photometers nicht zu überschreiten wurden nach Reaktionsstopp vom finalen Volumen (200 µl) vor der Messung 100 µl aus den Kavitäten entfernt. Die Höhe der Signalintensität mit dem verringerten Volumen in Abhängigkeit von der Ovalbuminkonzentration zeigt einen High-Dose-Hook-Effekt, der bei einer Konzentration von 8 µg/ml Ovalbumin beginnt.



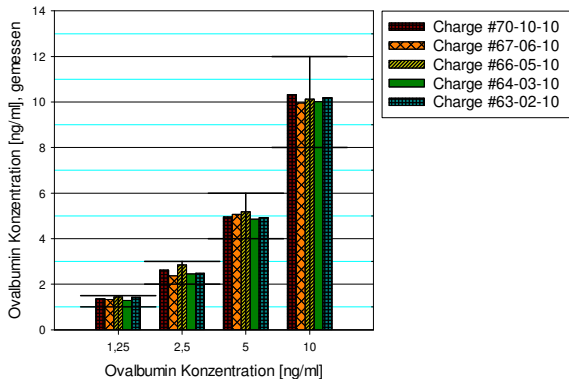
Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden Ovalbumin-Referenz-Proben mit theoretischen Konzentrationen von 10,0 ng/ml, 5,0 ng/ml, 2,5 ng/ml und 1,25 ng/ml in fünf verschiedenen Kit-Chargen getestet. Die chargenspezifischen Standards und die Referenzproben wurden in Doppelbestimmung untersucht. Aus dem Extinktionsmittelwert jeder Standardkonzentration wurde eine Standardkurve erstellt. An dieser wurden die Konzentrationen der unterschiedlichen Referenzen bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen der Referenzen in den fünf verschiedenen Chargen wurden gegen ihre theoretische Konzentration aufgetragen.

Korrelation zwischen gemessenen und erwarteten Konzentrationen der unterschiedlichen Referenzen. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichung der Standards ($\pm 2s$).

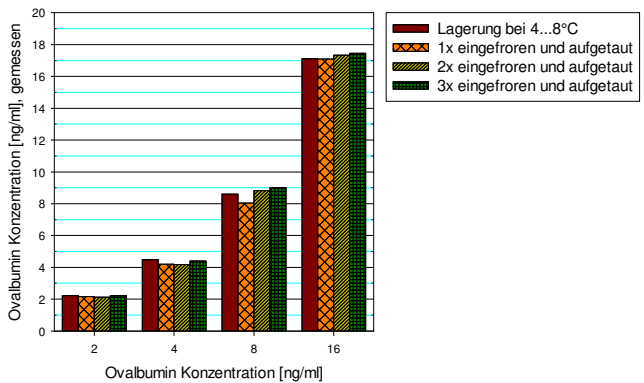


Wiederfindung der unterschiedlichen Referenzen in 5 unterschiedlichen Chargen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Bereich von $\pm 20\%$ [80 – 120% Wiederfindung] gemäß der ICH-Richtlinien.



Einfluss von Einfrieren und Auftauen

Ovalbumin-Referenz-Proben mit theoretischen Konzentrationen von 16,0 ng/ml, 8,0 ng/ml, 4,0 ng/ml und 2,0 ng/ml wurden zu vier Portionen aliquotiert. Ein Aliquot wurde bei 4...8 °C gelagert. Die übrigen drei Aliquots wurden einmal, zweimal und dreimal eingefroren und aufgetaut. Nach drei Tagen wurden alle Aliquots aufgetaut und in Doppelbestimmung in einem Versuchsansatz getestet. Alle Proben wurden unabhängig von der Anzahl der Einfrier-/Auftau-Zyklen im Bereich von ± 2 s bestimmt.



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 ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Waschpuffer, Substratlösung und Stopplösung.** 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. Vor dem Beginn der Testung ist ein Datenblatt vorzubereiten auf dem die Positionierung der Proben, Standards und Kontrolle vermerkt ist. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Proben 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!

Immer Schutzhandschuhe benutzen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Inkubationsschema *Serazym*[®] Ovalbumin (E-041a-1)

1.  100 µl **CONJ HRP** (6)
+
100 µl **verdünnte Probe**
100 µl **STD 1 – 7** (4)
100 µl **CONTROL** (5)




60 min Inkubation bei 37 °C

5 x Waschen mit Waschlösung

2.  100 µl **SUBSTR TMB** (7)

10 min Inkubation bei RT (20...25 °C), lichtgeschützt

3.  100 µl **STOP** (8)

Messung der Extinktion bei 450 / ≥ 620 nm

Änderungshistorie

| Version | Abschnitt | Änderungen |
|------------|--|---|
| 2018-11-23 | Anwendungsbereich | Aktualisierung |
| | Testkomponenten | Aktualisierung |
| | Berechnung der Ergebnisse | Aktualisierung |
| | Referenzwerte | Aktualisierung |
| | Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen | Aktualisierung |
| | Änderungshistorie | Einführen des Abschnittes „Änderungshistorie“ |



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten




Achtung



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Ovalbumin

Enzyme immunoassay for quantitative determination of Ovalbumin in biological fluids

REF E-041a-1  96

In vitro test



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

Intended use

Serazym[®] Ovalbumin is an enzyme immunoassay developed for the sensitive, quantitative determination of ovalbumin in biological fluids.

Principle of the test

Serazym[®] Ovalbumin is a fast immune enzymometric one-step assay based on affinity purified polyclonal antibodies (rabbit) against ovalbumin.

In the first step samples and horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-ovalbumin-antibodies are dispensed into the microtitration plate wells, that are coated with anti-ovalbumin-antibodies and incubated simultaneously at 37 °C / 99 °F for 60 minutes. After the incubation unbound components are removed by aspirating followed by a washing step.

In the second step the HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) within a 10 min reaction time at room temperature (20...25 °C / 68...77 °F) into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow.

The absorbance of the solution read at 450/≥620 nm (OD) is directly proportional to the amount of specifically bound ovalbumin. A standard curve is established by plotting the concentrations of the antibodies of the standards (x-axis) and their corresponding absorbance values (y-axis). The concentrations of the unknown specimens are directly read from the standard curve.

Test components

| | | For 96 Wells |
|---|-------------------------|---|
| 1 | WELLS | Microtitration plate coated with polyclonal anti-ovalbumin-antibodies (rabbit) |
| | | 12 single breakable 8-well strips vacuum-sealed with desiccant |
| 2 | WASHBUF CONC 10x | Wash buffer Seramun® Wash buffer D 10-fold |
| | | 50 ml concentrate for 500 ml solution white cap |
| 3 | DIL | Sample diluent Seramun® Sample diluent C |
| | | 50 ml ready to use coloured red black cap |
| 4 | STD 1-7 | Standard 1 – 7 STD1 = 20.0 ng/ml STD2 = 10.0 ng/ml; STD3 = 5.0 ng/ml STD4 = 2.5 ng/ml STD5 = 1.25 ng/ml STD6 = 0.625 ng/ml STD7 = 0.313 ng/ml |
| | | 1.0 ml per standard ready to use coloured red transparent cap |
| 5 | CONTROL | Control 7.5 ng/ml |
| | | 1.0 ml ready to use coloured red green cap |
| 6 | CONJ HRP | HRP-conjugate HRP-labelled, polyclonal anti-ovalbumin-antibodies (rabbit) in stabilizer solution |
| | | 15 ml ready to use coloured green red cap |
| 7 | SUBSTR TMB | Substrate SeramunBlau® automat fast 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide |
| | | 15 ml ready to use blue cap |
| 8 | STOP | Stop solution SeramunBlau® stop 0.25 M sulphuric acid |
| | | 15 ml ready to use yellow cap |
| 9 | COVER | Adhesive film |
| | | 1x |

Preparation and storage of samples

Collection and storage

Serazym® Ovalbumin is intended for the determination of the ovalbumin content in diluted biological fluids. Samples should not be stored longer than 48 hours at 2...8 °C / 36...46 °F prior to use. Otherwise a storage temperature of -20 °C / -4 °F is recommended. Frozen samples should be rapidly warmed to room temperature and mixed thoroughly before testing. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Preparation

Dilute samples with sample diluent (3) (usually 1 : 11 to 1 : 101). Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube and add 100 µl (1 : 11) or 10 µl (1 : 101) of the sample. After it mix the solution gently.

Materials required but not provided

Adjustable one-channel micropipette 0.100 - 1.000 ml and 0.010 - 0.100 ml · Adjustable 8-channel micropipette 0.050 - 0.200 ml · Pipette tips · Graduated measuring flasks 10 ml and 100 ml · Eppendorf tubes 2.0 ml · Microplate washer (automatic or hand wash head) · Microplate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · Reagent containers for dispensing with 8-channel pipette · Distilled or deionized water · Stop-watch · Incubator (37°C / 99°F)

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One test kit E-041a-1 (1x 96 wells) enables ovalbumin sensitive, quantification in a maximum of 40 samples respectively when samples, standards and control are run in duplicate. The complete test kit with unopened reagent bottles and microtitration strips is stable until the expiry date printed on the kit box in case of storage at 2...8 °C / 36...46 °F. Once opened all test kit components are stable for up to 2 months under appropriate storage conditions (2...8 °C / 36...46 °F). When stored at 2...8 °C / 36...46 °F the ready to use wash solution can be used for at least one month.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover with desiccant and carefully resealed.

Sample diluent

The sample diluent is ready to use. During storage at 2...8 °C / 36...46 °F precipitates may occur, that will dissolve when the solution is warmed to room temperature. Make sure the sample diluent has reached room temperature before starting the assay.

Wash solution

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or de-ionized water.

For example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Besides wash buffer all components of the device are ready-to-use.

Assay procedure

Dilute samples with sample diluent (3) (usually 1 : 11 to 1 : 101).

Attention: due to the „High-Dose-Hook-Effect“ in one-step assays very high ovalbumin concentrations may be falsely determined too low. Therefore it is recommended to investigate samples in two dilutions which differ by at least a factor of 10.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

The standards and control are ready to use. For larger sample series, it is recommended to pipette the reagents out of liquid reservoirs using a multichannel pipette to avoid time delays.

In case of using a washer make sure that the wells are completely filled (at least 300µl / well) and drained in every single washing cycle. In case of manual washing avoid foam and air bubbles in the wells. It is recommended to tap the plate onto absorbent paper after each washing cycle.

Make sure that the soak time of the wash solution in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 100 µl **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 100 µl **diluted samples**
100 µl **STD 1 – 7** standard 1-7 (4)
100 µl **CONTROL** control (5)

into the intended wells, mix gently.

It is recommended to run samples, standards and control in duplicate.

4. Cover plate **COVER** (9) and incubate for 60 min at 37 °C / 99 °F.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2))
Tap dry onto absorbent paper.
6. Dispense 100 µl **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 10 min at room temperature (20...25 °C / 68...77 °F), protected from light.
8. Dispense 100 µl **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result interpretation

A standard curve is created by plotting the measured average values of absorbance of the standards 1-7 (y-axis) against the declared ovalbumin concentration (x-axis).

For the standard curve use the 4-Parameter-regression-model.

Determine the ovalbumin concentration of the unknown samples by referring their mean absorbances to the reference curve and multiply the values with the dilution factor. Samples with ovalbumin concentrations exceeding those of standard 1 (20 ng/ml) should be retested in higher predilution (1 : 101 or higher if necessary).

Reference values

Test validity

A test run is valid if:

- the mean absorbance of standard 1 (20.0 ng/ml) is ≥ 1.50
- the mean absorbance of standard 7 (0.313 ng/ml) is ≤ 0.50
- the control is determined between 5.0 ng/ml and 10.0 ng/ml

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is correct (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, washing steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

False results may be caused by cross contaminations of the kit reagents and samples, bacterial or fungal contaminations of reagents and/or samples, incorrect washing, incorrect incubation times and incorrect handling of samples and standards.

Cross reactivity

Albumin from the following species have been tested with the *Serazym*[®] Ovalbumin and showed no cross reactivity:

Human Serum Albumin (HSA), Bovine Serum Albumin (BSA), Mouse Serum Albumin, Sheep Serum Albumin, Rabbit Serum Albumin

Performance characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in *Serazym*[®] Ovalbumin from 12-fold determinations.

| sample | mean OD | standard deviation | CV [%] |
|--------|---------|--------------------|--------|
| 1 | 2.508 | 0.081 | 3.23 |
| 2 | 1.937 | 0.039 | 2.00 |
| 3 | 1.573 | 0.066 | 4.20 |
| 4 | 1.135 | 0.042 | 3.74 |
| 5 | 0.645 | 0.025 | 3.83 |
| 6 | 0.281 | 0.013 | 4.48 |

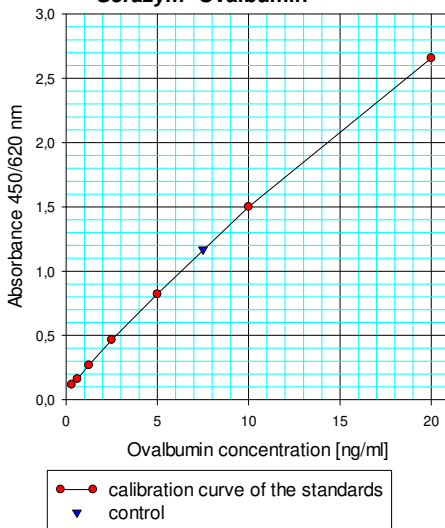
| sample | mean concentration [ng/ml] | standard deviation | CV [%] |
|--------|----------------------------|--------------------|--------|
| 1 | 5.07 | 0.23 | 4.54 |
| 2 | 4.09 | 0.31 | 7.58 |
| 3 | 3.28 | 0.26 | 7.93 |
| 4 | 2.18 | 0.06 | 2.75 |
| 5 | 1.59 | 0.07 | 4.28 |
| 6 | 0.78 | 0.03 | 3.59 |

Inter-assay coefficient of variation (CV) in *Serazym*[®] Ovalbumin in 24 different test runs.

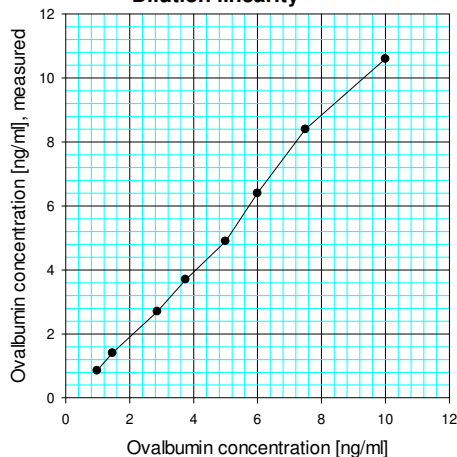
| sample | mean OD | standard deviation | CV [%] |
|--------|---------|--------------------|--------|
| 1 | 2.326 | 0.141 | 6.06 |
| 2 | 1.750 | 0.069 | 3.94 |
| 3 | 1.078 | 0.053 | 4.92 |
| 4 | 0.407 | 0.031 | 7.62 |

| sample | mean concentration [ng/ml] | standard deviation | CV [%] |
|--------|----------------------------|--------------------|--------|
| 1 | 8.83 | 0.73 | 8.27 |
| 2 | 4.55 | 0.29 | 6.37 |
| 3 | 3.04 | 0.21 | 6.91 |
| 4 | 0.82 | 0.05 | 6.10 |

Typical calibration curve of *Serazym*[®] Ovalbumin

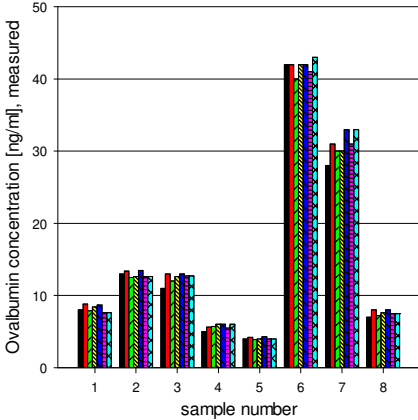


Dilution linearity



Ovalbumin concentration in vaccines

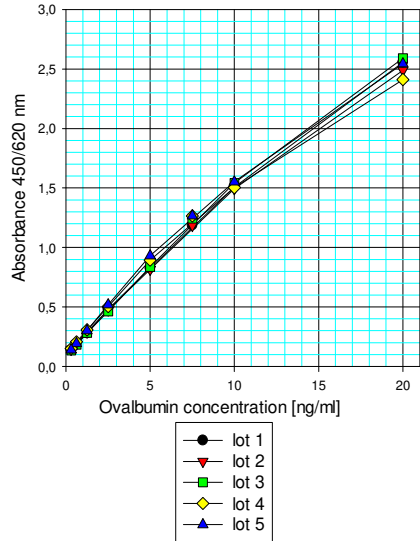
Quantification of samples in different standard series by various operators



- Declaration of the manufacturer
- Investigator A: series 1
- Investigator A: series 2
- Investigator A: series 3
- Investigator A: series 1
- Investigator A: series 2
- Investigator A: series 3

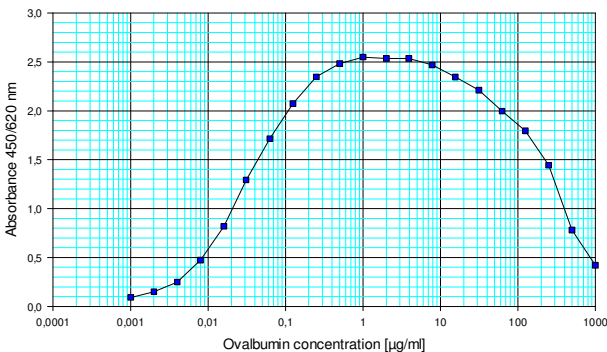
Lot-to-lot consistency

Standard curves of 5 different lots



High-Dose-Hook-Effect

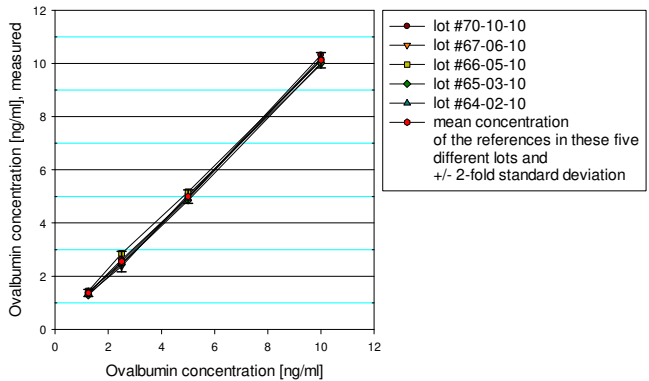
To determine the High-Dose-Hook-Effect which occurs in one-step-assays (simultaneous incubation of sample and conjugate), Ovalbumin concentrations of 0.001 $\mu\text{g/ml}$ – 1,000 $\mu\text{g/ml}$ were tested. In order to meet the measuring range of the photometer 100 μl of the final volume (200 μl) were removed after reaction stop. After volume reduction the dose dependent signal intensity reveals a High-Dose-Hook-Effect beginning with an Ovalbumin concentration of about 8 $\mu\text{g/ml}$.



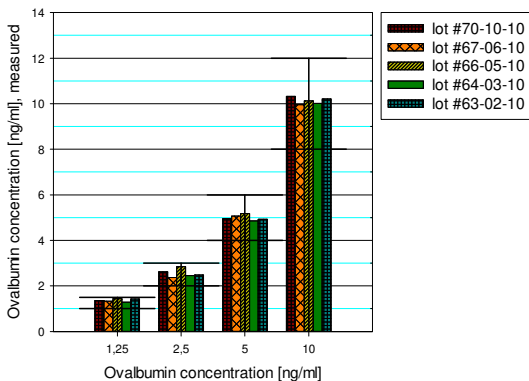
Recovery

For the determination of recovery ovalbumin reference samples with theoretical concentrations of 10.0 ng/ml, 5.0 ng/ml, 2.5 ng/ml and 1.25 ng/ml were run in 5 different lots. The lot specific standards and the ovalbumin reference samples were run in duplicate. The mean absorbance of each standard concentration was used to generate the standard curves, where the concentrations of the different references were determined. The calculated concentrations of the reference samples determined in the 5 different lots were plotted against their theoretical concentrations.

Correlation between measured and expected concentrations of the different references. Error bars demonstrate the twofold standard deviation ($\pm 2s$).



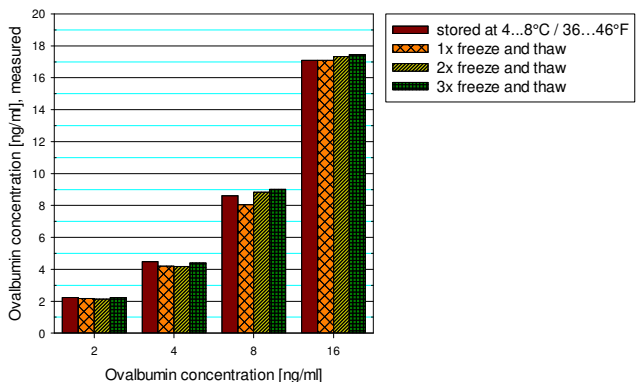
Recovery of the different references in 5 different lots. The error bars represent the range of $\pm 20\%$ [80 - 120% recovery] according to the ICH guidelines.



Influence of freezing and thawing

Ovalbumin reference samples with theoretical concentrations of 16.0 ng/ml, 8.0 ng/ml, 4.0 ng/ml and 2.0 ng/ml were aliquoted into 4 portions. One aliquot was stored at 4...8 °C / 36...46 °F. The remaining 3 portions were subjected to one, two and three freeze-thaw-cycles resp. after 3 days all aliquots were thawed and tested as twofold determination within one run.

As a result the mean concentrations of all samples are within the range of $\pm 2s$ irrespective of the number of freeze/thaw cycles.







Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The expiry date on the respective labels is appropriate to note. The same applies for the specified shelf life of the reconstituted reagents. **Do not use or mix reagents from different lots except for wash buffer, substrate solution and stop solution.** Do not use reagents from other manufacturers. Precisely adhere to the prescribed incubation times and temperatures. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8 °C / 36...46 °F before use. Prepare a data sheet that defines the positions of samples, standards and control before starting the assay. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They may neither be swallowed nor come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact rinse with plenty of water. The stop solution contains 0.25 mol/l sulphuric acid. Avoid contact with skin and mucous membranes. In case of contact rinse with plenty of water. Handle all samples as potentially infectious. Use a new pipette tip for each sample to avoid contaminations. Since the kit contains potentially infectious materials and hazardous chemicals, the following precautions must always be observed:

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













Incubation scheme *Serazym*[®] Ovalbumin (E-041a-1)

-  100 µl **CONJ HRP** (6)
+
100 µl **diluted sample**
100 µl **STD 1 – 7** (4)
100 µl **CONTROL** (5)
 60 min incubation at 37 °C / 99 °F
5 x wash with wash solution
-  100 µl **SUBSTR TMB** (7)
10 min incubation at room temperature (20...25 °C / 68...77 °F),
protected from light
-  100 µl **STOP** (8)
Read OD at 450 / ≥ 620 nm

History of changes

| Version | Section | Modifications |
|------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 2018-11-23 | Intended use | Update |
| | Test components | Update |
| | Result interpretation | Update |
| | Reference values | Update |
| | Common advices and precautions | Update |
| | History of Changes | Adding section "History of Changes" |

| | | | | |
|--|---|---|--|---------------------------|
|  Manufacturer |  Date of manufacture |  Use by | LOT Batch code | REF Catalog number |
|  Keep away from sunlight |  Temperature limits |  Biological risks |  Do not reuse | |
|  Consult instructions for use |  Caution |  Contains sufficient for <n> tests | | |