

NovaLisa™

Coxiella burnetii (Q-Fever) Phase 2

IgM - ELISA



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Coxiella burnetii in human serum

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Coxiella burnetii in Humanserum

Enzyme immunoassay pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre la Coxiella burnetii en sérum humain

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per Coxiella burnetii nel siero

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra – Coxiella burnetii en suero

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 12
Français:	Page	à
Italiano:	da Pagina	13 a 17
Espanol:	Página	a

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	18
---	--	----

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	19
--	--	----

Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ Pagina / Página	20
--	---	----

1. INTRODUCTION

Q-Fever is a disease that results from infection with small, polymorph and gram-negative bacteria called *Coxiella burnetii*. After an outbreak in Brisbane, Australia, the responsible organism was isolated and named *Coxiella burnetii* in honour of Dr. Herald Rae Cox and Sir Frank Burnet. New molecular research demonstrated a close relationship to *Legionella*. The zoonosis Q-Fever is found everywhere except New Zealand (no data available). There is an extensive reservoir (mainly ticks) of *C. burnetii*. Ticks are an important vector of the pathogen in the transmission between domestic and wildlife animals. But the ticks are unimportant in the direct infection of humans. Cattles, sheep and goats are usually the source of transmission of this microorganism to humans. However cats, dogs and rabbits are also important in this regard. In most instances humans become infected with *Coxiella burnetii* following inhalation of contaminated aerosols (respiratory tract). The incubation period for Q-Fever in humans is about 2 weeks. The resulting illness can be divided into acute and chronic varieties. During the acute phase of illness antibodies to the phase II-antigen are formed. Anti phase-I antibodies in high titers are typical for a chronic disease.

In areas where Q-Fever is endemic, 12% or more of the population have antibodies to *C. burnetii*. Most of the infections are subclinical or undiagnosed.

The acute infection shows symptoms of high fever, shivers, muscle pain and headache. Later on more severe diseases such as pneumonia or hepatitis can occur. Infections during pregnancy can lead to an abort or premature birth. Approximately 1% of all infections become chronic. The most frequent organ manifestation in Q-Fever is endocarditis.

Diagnostic methods:

- Complement binding reaction is still used
- IFT (immuno fixation test)
- ELISA
- Cell culture
- PCR

IFT as well as ELISA differentiate between different antibody classes (IgG/ IgM/ IgA).

Acute phase of Q-Fever

IgM specific to phase 2 after 2-3 weeks
 IgG approximately 2 months after infection

Chronic phase of Q-Fever

From 6 weeks up to 4 months after infection phase 1 IgG and IgA antibodies can be detected.

2. INTENDED USE

The NovaLisa ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against *Coxiella burnetii* phase 2 in the early stages of infection in human serum.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies to *Coxiella burnetii* is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with phase 2 antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgM conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Coxiella burnetii* -specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of phase 2-specific IgM antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **C. burnetii phase 2 Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with phase 2 antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **C. burnetii anti-IgM Conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM; coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.

- **C. burnetii IgM Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **C. burnetii IgM Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **C. burnetii IgM Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Pipe stand
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with phase 2 antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °; stability until expiry date. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.2. C. burnetii anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, anti-human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains antihuman IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

After first opening stability until expiry date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl C. burnetii anti-IgM Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.

Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value **< 0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value **< 0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value **> cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{NTU}]$$

Example: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (Units)}$

Cut-off:	10	NTU
Grey zone:	9-11	NTU
Negative:	<9	NTU
Positive:	>11	NTU

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (NTU)</u>	<u>Cv (%)</u>
Positive serum	6 (2)	16.8	7.7
Positive serum	6 (2)	19.2	2.4

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (OD)</u>	<u>Cv (%)</u>
Positive serum	15	0.38	2.9
Positive serum	16	0.72	2.0

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is > 90 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is > 90 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.5 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

Cross reactivity with antibodies against CMV, Dengue virus, EBV and Mycoplasma cannot be excluded.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: COX2M0600 Coxiella burnetii (Q-Fever) Phase 2 IgM -ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Q-Fieber entsteht durch eine Infektion mit *Coxiella burnetii*, einem kleinen, polymorphen, gram-negativen Bakterium. Nach einem Q-Fieber Ausbruch in Brisbane, Australien, wurde der Erreger isoliert. Zu Ehren der von Dr. Herald Rae Cox und Sir Frank Burnet *Coxiella burnetii* genannt. Neue molekularbiologische Untersuchungen haben eine enge Verwandtschaft zu *Legionella* gezeigt. Q-Fieber ist eine Zoonose, die überall mit Ausnahme von Neuseeland auftritt. Zecken stellen ein großes Reservoir für den Erreger dar. Zecken sind ein wichtiger Vektor des Pathogens bei der Übertragung zwischen Wild- und Haustieren. Bei der Übertragung auf den Menschen spielen Zecken jedoch keine Rolle. Kälber, Schafe und Gänse sind gewöhnlich die Infektionsquellen für Menschen. Katzen, Hunde und Kaninchen spielen in diesem Zusammenhang auch eine wichtige Rolle. Die Infektion des Menschen erfolgt in der Regel über die Inhalation kontaminierter Aerosole. Die Inkubationszeit beträgt ca. 2 Wochen. Die folgende Erkrankung tritt in zwei Varianten auf, der akuten und der chronischen Infektion. Während der akuten Phase werden Antikörper gegen das Phase 2 Antigen gebildet. Hohe Antikörpertiter gegen Phase 1 Antigene treten typischer Weise bei einer chronischen Erkrankung auf.

In Regionen mit endemisch auftretendem Q-Fieber besitzen mindestens 12% der Bevölkerung Antikörper gegen *Coxiella burnetii*. Die meisten Infektionen bleiben subklinisch oder werden nicht diagnostiziert.

Die akute Infektion ist mit hohem Fieber, Schüttelfrost, Muskel- und Kopfschmerzen verbunden. Im Laufe der Zeit können schwerere Erkrankungen folgen wie Pneumonie und Hepatitis. Infektionen während der Schwangerschaft können zum Abort oder zu Frühgeburten führen. Etwa 1% der Infektionen werden chronisch. Die häufigste Organmanifestation von Q-Fieber ist die Endocarditis.

Diagnose:

- Komplementbindungsreaktion (KBR)
- IFT (Immunofixationstest)
- ELISA
- Zellkultur
- PCR

IFT und ELISA differenzieren zwischen den verschiedenen Antikörperklassen (IgG, IgM, IgA).

Akute Phase

IgM spezifisch für Phase 2 nach 2-3 Wochen
 IgG ca. 2 Monate nach der Infektion

Chronische Phase

Zwischen 6 Wochen und 4 Monaten nach der Infektion können Phase 1 IgG und IgA Antikörper nachgewiesen werden.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der Novalisa ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM -Antikörper gegen *Coxiella burnetii* Phase 2 in humanem Serum bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Ig M-Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* Phase 2 beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Phase 2 spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human-IgM Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **C. burnetii Phase 2 beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Phase 2 Antigen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0,2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.

- **C. burnetii anti-IgM-Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **C. burnetii IgM Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **C. burnetii IgM Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **C. burnetii IgM Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Phase 2 Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. C. burnetii anti-IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerretticherperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält anti-human-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serumproben verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70... -20°C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!* Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefung	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

***Beachte:** Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl C. burnetii anti-IgM-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** *Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.*
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**

10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
- Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionwerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: 0.37 OD Cut-off Kontrolle + 0.39 OD Cut-off Kontrolle = 0.76 : 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

Mittlere Extinktion der Patientenprobe x 10 = [Einheiten = NTU]
Cut-Off

Beispiel: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (NTU)</u>	<u>Vk (%)</u>
Positives Serum	6 (2)	16,8	7,7
Positives Serum	6 (2)	19,2	2,4

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Vk (%)</u>
Positives Serum	15	0,38	3,4
Positives Serum	16	0,78	2,6

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist > 90 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >90 %.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,5 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen CMV, Dengue Virus, EBV und Mycoplasma können nicht ausgeschlossen werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: COX2M0600 Coxiella burnetii (Q-Fever) Phase 2 IgM-ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUZIONE

La febbre Q è una malattia causata dall'infezione con batteri piccoli, polimorfi e Gram positivi chiamati *Coxiella burnetii*. Dopo un primo episodio in Brisbane, Australia, l'organismo responsabile è stato isolato e denominato *Coxiella burnetii* in onore di Dr. Herald Rae Cox e Sir Frank Burnet. Le nuove tecniche molecolari hanno dimostrato che esiste una stretta relazione con la *Legionella*. La zoonosi della febbre Q viene ritrovato ubiquitariamente, con eccezione della Nuova Zelandia (dati non disponibili). Esiste un reservoir esteso (soprattutto zecche) di *C. burnetii*. Le zecche sono un vettore importante del patogeno per la trasmissione tra animali domestici e selvatici. Queste zecche però non sono importanti per l'infezione diretta dell'uomo. Bovini, pecore e capre sono solitamente la fonte di trasmissione di questo microorganismo all'uomo. Comunque, anche cani, gatti e conigli sono altrettanto importanti. Nella maggior parte dei casi uomini si infettano con *Coxiella burnetii* dopo l'inalazione di aerosoli contaminati (tratto respiratorio). Il periodo di incubazione per la febbre Q nell'uomo è di circa 2 settimane. La malattia risultante può essere divisa in una fase acuta e una cronica. Durante la fase acuta della malattia, si formano anticorpi ad antigeni della fase 2. Anticorpi anti-fase 1 a livelli elevati sono tipici per la malattia cronica.

In aree dove la febbre Q è endemica, 12 % o più della popolazione portano anticorpi a *C. burnetii*.

La maggior parte delle infezioni è subclinica o non viene diagnosticata.

L'infezione acuta mostra sintomi di febbre alta, brividi, dolori muscolari e mal di testa. Più tardi possono occorrere malattie più serie come la pneumonia o l'epatite. L'infezione durante la gravidanza può portare all'aborto o alla nascita prematura. Approssimativamente 1 % delle infezioni diventa cronico. La manifestazione organica più frequente della febbre Q è l'endocardite.

Metodi diagnostici:

- Il legame complementare è ancora usato
- IFT (test di immunofissazione)
- ELISA
- Coltura cellulare
- PCR

IFT come ELISA differenzia tra classi differenti di anticorpi (IgG/ IgM/ IgA).

Fase acuta di febbre Q

IgM specifico per la fase 2 dopo 2-3 settimane

IgG circa 2 mesi dopo l'infezione

Fase cronica di febbre Q

Da 6 settimane fino a 4 mesi dopo l'infezione si possono rilevare anticorpi IgG e IgA di fase 1.

2. USO PREVISTO

Il NovaTec ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per *Coxiella burnetii* fase 2 nel siero umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per *Coxiella burnetii* si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici della *Coxiella burnetii*. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgM umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per la fase 2 di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni della *Coxiella burnetii* fase 2 (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della *Coxiella burnetii* fase 2; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM***:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color verde; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):*** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *C. burnetii* anti IgM**:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgG umani, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.

- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **C. burnetii IgM Controllo positivo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **C. burnetii IgM Controllo Cut-off***:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **C. burnetii IgM Controllo negativo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra +2...+8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20...+25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati della *C. burnetii* fase 2. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra +2...+8°C.*

6.2. Coniugato C. burnetii IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra +2...+8°C.*

6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra +2...+8°C.*

6.4. Tampone diluente IgM

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dagli campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra +2...+8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra +2...+8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra +2...+8 °C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a 37° ± 1°C

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37° ± 1°C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

***Attenzione:** Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.*

5. Pipettare 100µl di Coniugato C. burnetii anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20°...25 °C).** *Non esporre a fonti di luce diretta.*
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20°...25°C) al buio.**
10. Pipettare 100µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

***Attenzione:** Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgG. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.*

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza **< 0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza **< 0.200 e < cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza **>Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off è la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38

Cut-Off = 0.38

9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

Assorbanza media del campione x 10 / Cut-Off = [unità NovaTec = NTU]

Esempio: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media(NTU)	Cv (%)
---------------	---	------------	--------

Siero pos	6 (2)	16,8	7,7
-----------	-------	------	-----

Siero pos	6 (2)	19,2	2,4
-----------	-------	------	-----

Intradosaggio	n	Media (OD)	CV (%)
---------------	---	------------	--------

Siero pos.	15	0,38	3,4
------------	----	------	-----

Siero pos.	16	0,78	2,6
------------	----	------	-----

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a >90 %.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a > 90 %.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

La reattività ad incrocio con anticorpi CMV, virus Dengue, EBV e Mycoplasma non può essere esclusa.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.
ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: COX2M0600 Coxiella burnetii (Q-Fever) Phase 2 IgM-ELISA (96 determinazioni)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA






Mc Dade JE: Historical aspects of Q-Fever: The disease. CRC Press, 1990, 5

Marrie TS: Coxiella burnetii pneumonia. Clin Infect Disease 21 (Suppl. 3), 1995, 253

Raoult D and Marrie T: Q-Fever. Clin Infect Disease 20, 1995, 489

Kaplan MM and Bertagna, P: The geographical distribution of Q-Fever. Bull World Health Organ 13, 1995, 829

Dellacasagrande J, et al.: C. burnetii survives in monocytes from patients with Q-Fever endocarditis. Infect Immun 68, 2000, 160

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérums de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérums de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérums de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
DIL M	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB
WASHBUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Coxiella burnetii (Q-Fever) Phase 2 IgM-ELISA

Test preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@-ID.com

Internet: www.-ID.com

COX2M0600engl,dt,it-05052011-CR