



ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgG

ODZ-235

Gebrauchsanweisung

HERSTELLER: VIDIA spol.s r.o., Nad Safinou II 365, 252 50 Vestec, Tschechische Republik, Tel.: +420 261 090 565, Fax: +420 261 090 566, www.vidia.cz

1. TITEL

ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgG – ein ELISA Testkit für die Bestimmung von IgG Antikörpern gegen HHV-6 in humanem Serum.

2. ZWECKBESTIMMUNG

Das Testkit ist bestimmt für die serologische Diagnostik von Krankheiten, die mit Humanen Herpes-Viren 6 assoziiert sind, wie zum Beispiel Exanthema subitum (Drei-Tage-Fieber), akute Erkrankungen der Atemwege, Durchfall mit Fieber und Fieberkrämpfe bei Kleinkindern, heterophile Antikörper-negative infektiöse Mononukleose bei Kindern und interstitielle Pneumonie, Enzephalitis, Meningitis, Hepatitis und aplastische Anämie in immungeschwächten Patienten. Die Anwesenheit von IgG-Anti-HHV-6-Antikörpern zeigt den Immunstatus des Patienten. Deutlicher Anstieg der anti-HHV-6-IgG-Antikörper in gepaarten Serumproben, der während der akuten Phase und Rekonvaleszenzphase der Infektion genommen ist, ist bezeichnend für eine aktive Infektion. Der Test unterscheidet nicht zwischen HHV-6-Subtyp A und B.

3. TESTPRINZIP

ELISA-VIDITEST Anti-HHV-6-IgG-Test ist ein Festphasen-Immunoassay. Die Streifen werden mit nativen HHV-6-Antigen beschichtet. Falls die getesteten Seren Anti-HHV-6-Antikörper enthalten, binden diese sich an die immobilisierten Antigene. Die Antigen-Antikörper-Komplexe reagieren anschließend mit tierischen Anti-Human-IgG-Antikörpern, die mit Meerrettichperoxidase markiert sind. Die Menge der gebundenen markierten Antikörper wird durch eine enzymatische Farbreaktion bestimmt. Negative Seren reagieren nicht - eine leichte Farbveränderung, falls vorhanden, kann dem Reaktionshintergrund zugeschrieben werden.

4. TESTKITKOMPONENTEN

ELISA mit nativem Antigen beschichtete Streifen	STRIPS	Ag	1 Mikrotiterplatte
1.3 mL Standard A=negatives Kontrollserum, gebrauchsfertig	STA/CTRL-		1 Flasche
1.3 mL Standard D=Standard 1 (Kalibrator), gebrauchsfertig	STD/ST1		1 Flasche
1.3 mL Standard E=Standard 2 (positives Kontrollserum), gebrauchsfertig	STE/ST2		1 Flasche
13 mL Meerrettichperoxidase-markierte anti-humane IgG Antikörper (Px-Konjugat), gebrauchsfertig	CONJ		1 Flasche
55 mL Waschpuffer 10x Konzentrat	WASH	10x	1 Flasche
60 mL Verdünnungspuffer anti-HHV6, gebrauchsfertig	DIL		1 Flasche
13 mL Chromogenes Substrat (TMB Substrat), gebrauchsfertig	TMB-O		1 Flasche
13 mL Stopp-Lösung, gebrauchsfertig	STOP		1 Flasche

Gebrauchsanweisung
Qualitätszertifikat

Verdünnungspuffer **DIL** ist nur für ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgG und IgM Testkit bestimmt. Chromogenes Substrat **TMB-O** ist kompatibel und austauschbar zwischen ELISA-VIDITEST Testkits, die **TMB-O** enthalten, aber nicht mit anderen chromogenen Substraten **TMB**, **TMB-BF**.

5. BENÖTIGTES MATERIAL, ABER NICHT IM TESTKIT MITGELIEFERT

1. Destilliertes oder deionisiertes Wasser zur Verdünnung des Waschpuffer-Konzentrats.
2. Ausreichende Ausrüstung zum Pipettieren, zur Flüssigkeitsentfernung und zum Waschen
3. Spektralphotometer/Colorimeter (Mikrotiterplatten-Reader - Wellenlänge 450 nm).

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND PROBEN

- a. Lassen Sie alle Testkitkomponenten auf Raumtemperatur erwärmen (19-28°C).
- b. Schütteln Sie die Proben, die Standards und die Negative Kontrolle, um die Homogenität zu gewährleisten und durchmischen Sie alle Lösungen gut vor Gebrauch.
- c. Verdünnen Sie die Serumproben 1:100 in Verdünnungspuffer (5 µL Serumprobe + 500 µL Verdünnungspuffer). Verdünnen Sie die Kontrollen (Standards) **nicht**, diese werden in Arbeitskonzentration geliefert (gebrauchsfertig).
- d. Bereiten Sie Waschpuffer durch Verdünnung des Waschpuffer-Konzentrates 10-mal mit einer entsprechenden Menge von destilliertem oder deionisiertem Wasser (zB 50 mL Waschpuffer + 450 mL destilliertes Wasser) zu. Wenn Salzkristalle im Waschpuffer vorhanden sind, erwärmen Sie die Fläschchen auf +32 bis +37°C in einem Wasserbad. Verdünnter Waschpuffer ist für einen Monat bei Labortemperatur stabil.
- e. Verdünnen Sie Px-Konjugat, TMB Substrat und Stopp-Lösung **nicht**, diese werden in Arbeitskonzentration geliefert (gebrauchsfertig).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

- a. Lassen Sie den vakuumverschlossenen Aluminiumbeutel mit Streifen die Raumtemperatur erreichen (19-28°C). Entnehmen Sie eine ausreichende Anzahl von Streifen und legen Sie die unbenutzten Streifen in den Beutel zurück und verschließen Sie ihn sorgfältig zusammen mit dem Trockenmittel im Inneren.
- b. Pipettieren Sie 100 µL Verdünnungspuffer, Standards, Negativkontrolle und Serumproben in die Kavitäten nach dem Pipettierschema in Abbildung 1: Starten Sie mit dem Befüllen der ersten Kavität mit Verdünnungspuffer **DIL**, der nächsten zwei Kavitäten mit Standard 1 **ST D/ST 1**, nächste Kavität mit positivem Kontrollserum **ST E/ST 2** einzufüllen und der fünften mit negativem Kontrollserum **ST A/CTRL**. Standard 1 dient als Kalibrator. Füllen Sie die restlichen Kavitäten mit verdünnten Serumproben (S1, S2, S3, ...). Es ist ausreichend, die Proben und Kontrollen als Singles zu pipettieren, aber wenn Sie Laborfehler minimieren wollen, pipettieren Sie die Kontrollen und Proben im Doppelansatz.
- c. Inkubieren Sie 60 Minuten (±5 min) bei Raumtemperatur.
- d. Saugen Sie die Flüssigkeiten aus den Kavitäten in eine Sammelflasche mit geeignetem Desinfektionsmittel (siehe Sicherheitshinweise). Waschen Sie die Kavitäten viermal mit 250 µL/Kavität Waschpuffer und saugen jedes Mal ab. Vermeiden Sie Kreuzkontaminationen zwischen Kavitäten!
Wenn ein bisschen Flüssigkeit in den Kavitäten bleibt, drehen Sie die Platte um und schlagen Sie sie auf Filterpapier aus, um die letzten verbliebenen Tropfen zu entfernen.
- e. Pipettieren Sie 100 µL Px-Konjugat (gebrauchsfertig) **CONJ** in jede Kavität.
- f. Inkubieren Sie 60 Minuten (±5 min) bei Raumtemperatur.
- g. Saugen und waschen Sie die Kavitäten viermal mit 250 µL/Kavität Waschpuffer.
- h. Geben Sie 100 µL **TMB-O** Substrat in jede Kavität.
- i. Inkubieren Sie 20 Minuten (+/-30 Sekunden) bei Raumtemperatur.
Die Zeitmessung muss zu Beginn der Verteilung des TMB-O Substrates starten.

Decken Sie die Streifen mit einer Aluminiumfolie ab, oder bewahren Sie sie im Dunkeln während der Inkubation mit TMB-O Substrat auf.

- j. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung **STOP**. Verwenden Sie den gleichen Rhythmus wie beim Pipettieren des TMB-O Substrates, um die gleiche Reaktionszeit in allen Kavitäten zu gewährleisten. Tippen Sie sanft ein paar Mal auf die Mikrotiterplatte, um eine vollständige Durchmischung der Reagenzien zu gewährleisten.
- k. Lesen Sie die Absorption bei **450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader innerhalb 20 Minuten**. Es wird empfohlen, Referenzwert von 620 bis 690 nm zu verwenden.

Abb 1: Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	DIL	S4										
b	ST D/ST 1	S...										
c	ST D/ST 1											
d	ST E/ST 2											
e	ST A/CTRL-											
f	S1											
g	S2											
h	S3											

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Beginnen Sie mit der Subtraktion der Extinktion der DIL Kavität (Leerwert) von der Extinktion aller anderen Kavitäten.

8.1 Qualitative Bewertung

1. Berechnen Sie den Mittelwert der Extinktion des Standards 1 **ST D/ST 1**. (Wenn der Standard 1 in drei Parallelen bestimmt wurde und die Extinktion einer Kavität sich vom Mittelwert um mehr als 20% unterscheidet, dann schließen sie diesen Wert aus und berechnen Sie einen neuen Extinktion-Mittelwert ohne diesen Wert).
2. Berechnen Sie den Cut-off-Wert durch Multiplikation des Mittelwerts des Standards 1 mit einem Korrekturfaktor. **Der Korrekturfaktor von Standard 1 ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.**
3. Proben mit einer Extinktion weniger als 90% des Cut-off-Wertes sind negativ und Proben mit einer Extinktion höher als 110% des Cut-off-Wertes sind positiv.

8.2. Semiquantitative Bewertung

Bestimmung des Indexwertes:

1. Berechnen Sie den Cut-off-Wert (siehe 8.1)
2. Berechnen Sie den Indexwert für jede Probe nach der Formel:

$$\text{Indexwert} = \frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Cut-off-Wert}}$$

3. Interpretieren Sie die Serumreaktivität nach den Daten in der Tabelle 1 (Interpretation der Ergebnisse)

Tabelle 1. Interpretation der Ergebnisse

<u>Indexwert</u>	<u>Interpretation</u>
< 0.90	Negativ
0.90 - 1.10	+/-
> 1.10	Positiv*

* auf der Basis des Positivitätsindexwertes ist es möglich, die Menge der Antikörper in der Probe semiquantitativ zu bestimmen.

Hinweis! Grenzwertige Reaktivität, d.h. als +/- interpretiert, erfordert eine Wiederholungstestung der Proben. Wenn das Ergebnis dann wieder grenzwertig ist, ist es empfehlenswert, eine alternative Testmethode zu verwenden, oder eine weitere Probe von den Patienten 1-2 Wochen später zu nehmen.

Berechnungsbeispiel:

Standard 1 - Extinktionen	= 1.407; 1.377
Standard 1 - Mittelwert	= 1.392
Korrekturfaktor	= 0.21
Cut-off-Wert	= 1.392*0.21 = 0,292
Probenextinktion	= 1.200
Indexwert	= 1.200 / 0.292 = 4.11

9. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Anti-HHV-6-IgG-Antikörper haben einen anamnesticen Charakter. Sie bleiben lebenslang nach der Primärinfektion im Serum. Das Testkit kann kreuzreaktive Antikörper gegen HHV-7 erkennen. Signifikanter Anstieg der IgG-Antikörper kann durch die Reaktivierung der Infektion verursacht werden, aber wegen dem wiederkehrenden Charakter der Reaktivierung kann nicht immer nachgewiesen werden. Für die endgültige Diagnose sollten die klinischen Symptome des Patienten in Betracht gezogen werden. Ergebnisse bei immunsupprimierten Patienten sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

10. GÜLTIGKEIT, SPEZIFITÄT UND EMPFINDLICHKEIT DES TESTS

10.1 Testgültigkeit

Der Test ist gültig wenn:

- der Leerwert (die Extinktion des Verdünnungspuffers) kleiner als 0.150 ist.
- das Verhältnis Negative Kontrolle $\frac{ST\ A/CTRL-}{Cut-off-Wert}$ kleiner als 0.9 ist.
- das Verhältnis Positive Kontrolle $\frac{ST\ E/ST\ 2}{Cut-off-Wert}$ grösser als 1.1 ist.
- der mittlere Extinktionswert von Standarden / Kontrollen und Extinktionswert von Proportion $\frac{ST\ E/ST\ 2}{ST\ D/ST\ 1}$ in dem Bereich sind, die im **Qualitätskontrollzertifikat** für dieses Testkit angegeben sind.

10.2 Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay und Inter-Assay Präzision wurden für Proben mit unterschiedlichen Extinktionswerten berechnet. In anti-HHV-6 IgG-positiven Proben haben die Intra-Assay und Inter-Assay Variationskoeffizienten (CV) 8% und 15% der mittleren Extinktionswerten nicht überschritten.

Ein Beispiel der **Intra-Assay** Variabilität (n= Zahl der Parallelbestimmungen im gleichen Test)

n	A	$\pm\delta$	CV
14	1.536	0.036	2.3 %
16	1.891	0.042	2.2 %

Ein Beispiel der **Inter-Assay** Variabilität (n= Zahl der Bestimmungen in mehreren unabhängigen Tests)

n	A	$\pm\delta$	Min.- max.	CV
5	1.601	0.145	1.425-1.747	9.1 %
5	1.162	0.075	1.086-1.238	6.5 %

10.3 Sensitivität und Spezifität des Tests

Die diagnostische Sensitivität des Tests beträgt 99% und die Spezifität 95%. In einer Vergleichungstestung des ELISA-VIDITEST Anti-HHV-6 Testskits mit anderen kommerziellen ELISA-Tests wurden folgende Ergebnisse gefunden.

HHV-6 Status	Negativ	Grenzwertig	Positiv	Summe
Seronegativ	40	1	2	43
Seropositiv	3	0	245	248

10.4 Test Genauigkeit

10.4.1 Wiederfindungsrate (Spike-recovery test)

Die Messwerte variieren für jede Charge in einem Bereich von 80 bis 120% der erwarteten Werte.

10.4.2 Interferenzen

Hämolytische (bis 50 mg/mL Hämoglobin) und lipämische (bis 50 mg/mL Triglyceride) Proben oder Seren mit erhöhten Bilirubinwerten (bis 5 mg/mL Bilirubin) haben keinen Einfluss auf die Testergebnisse. Die Untersuchung solcher Proben wird jedoch nicht empfohlen.

11. SICHERHEITSHIMASSNAHMEN

Alle Bestandteile des Testskits sind nur für den Laborgebrauch bestimmt.

Kontrollen enthalten Humanseren, die auf HBsAg, Anti-HIV-1,2 und anti-HCV geprüft und für negativbefunden wurde. Allerdings sollten sie als potentiell infektiöses Material angesehen und nach den entsprechenden Vorschriften behandelt und entsorgt werden.

Autoklavieren Sie für eine halbe Stunde bei 121°C alle wiederverwendbaren Materialien, die im Kontakt mit den menschlichen Proben waren, brennen Sie entzündliche Einwegmaterialien, dekontaminieren Sie Flüssigabfälle und unbrennbare Materialien mit 3% Chloramine. Säure enthaltende Flüssigabfälle (Stopp-Lösung) sollten in 4% Natriumbicarbonat-Lösung neutralisiert werden.

Die Stopp-Lösung soll mit Sorgfalt behandelt werden. Kontakt mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Bei Hautkontakt sofort gründlich mit viel Wasser abspülen und den Arzt konsultieren.

Nicht rauchen, essen oder trinken während der Arbeit. Nicht mit dem Mund pipettieren. Schutzhandschuhe tragen und nach der Arbeit Hände gründlich waschen. Verschütten oder Aerosol Herstellung vermeiden.

12. SICHERHEITSHINWEISE BEI DER DURCHFÜHRUNG

Der Hersteller garantiert die Funktionsfähigkeit des gesamten ELISA-Testkits. **Verdünnungspuffer DIL und Chromogenes Substrat TMB-O sind nur für ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgG und IgM Testskit bestimmt und sind nicht kompatibel mit anderen ELISA-VIDITEST Testskits.**

Folgen Sie der Testanleitung.

Standards, Negativkontrolle, Verdünnungspuffer, Chromogenes Substrat und PX-Konjugat enthalten Konservierungs ProClin 300®.

Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination von Serumproben und Testreagenzien.

Vermeiden Sie Kreuzkontamination von Reagenzien.

Vermeiden Sie den Kontakt des TMB-O Substrats mit Oxidationsmitteln oder Metalloberflächen.

Abweichungen in den Testergebnissen sind meistens verursacht durch:

- * Unzureichende Vermischung der Reagenzien und Proben
- * Ungenau pipettieren und unzureichende Inkubationszeiten
- * Schlechte Waschtechnik oder Kreuzkontamination der Kavität mit der Probe oder Px-Konjugat
- * Die Verwendung von identischen Pipettenspitze für verschiedene Lösungen









13. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Bewahren Sie das Testkit und die Reagenzien bei 2-10°C an einem kühlen und trockenen Ort auf. Bewahren Sie unbenutzte Streifen in dem verschließbaren Beutel mit dem Trockenmittel im Inneren. Bewahren Sie Serumproben bei 2-10°C bis zu einer Woche auf. Über einen längeren Zeitraum lagern Sie die Proben aliquotiert bei -20°C. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren. Bewahren Sie die verdünnten Proben nicht auf, sie sollen immer frisch verdünnt werden.

Die Testkits werden gekühlt transportiert. Eine Transportzeit von 72 Stunden hat keinen Einfluss. Wenn Sie irgendwelche Schäden an Teilen des Testkits finden, informieren Sie bitte sofort den Hersteller.

Das Verfallsdatum ist auf dem ELISA-Testkit-Etikett und auf den Etiketten aller Reagenzien angegeben.

14. SYMBOLE:

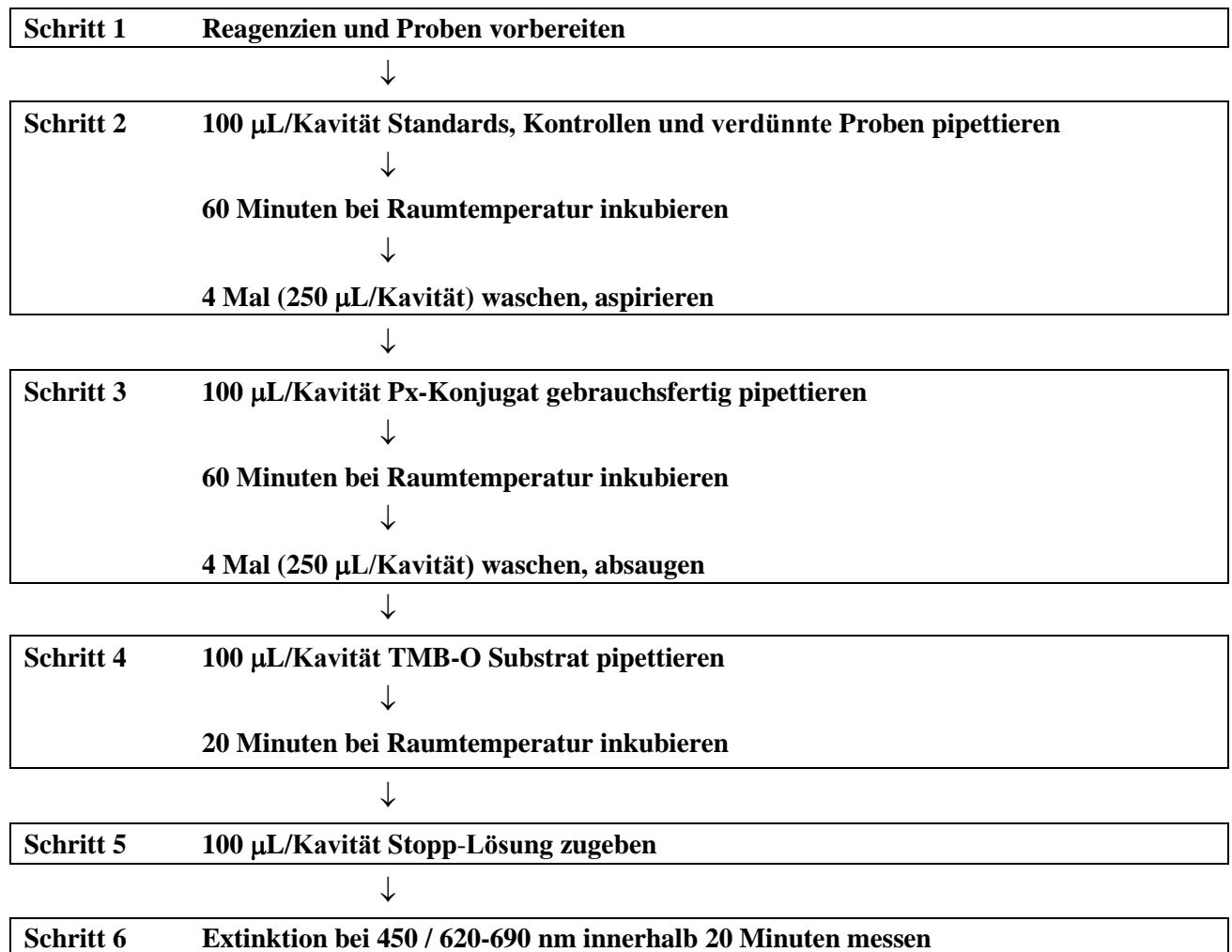
-  anzahl der Tests
-  Conformité Européenne – Produkt mit den europäischen Rechtsvorschriften entspricht
-  diagnostik *in vitro*
- $\pm\sigma$ Standardabweichung
- CV variationskoeffizienten
- OD extinktionen
-  produzent
-  expiration
-  chargen
-  2°C 10°C bewahren bei $+2^{\circ}\text{C}$ - $+10^{\circ}\text{C}$
- $^{\circ}\text{C}$ grad Celsius
- % perzent
- n snzahl der Tests
- A der Wert einer Probe
-  lesen Sie die Informationen in dem Kit eingeschlossen

Referenzen:

Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Joseph S.F., Sturzenegger S., Kaplan M. Halligan G., Biberfeld P., Wong-Stall F., Kramarsky B., Gallo R.C.; Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science 234: 596-601, 1986

De Bolle L., Naesens L., De Clercq E., Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features and Therapy, Clinical Microbiology Reviews, 217-245, 2005

15. TESTSCHEMA



Datum der letzten Überarbeitung dieser Gebrauchsanweisung: 01/2017

Die Entwicklung dieses Testkitss wurde finanziell vom Ministerium für Industrie und Handel der Tschechischen Republik unterstützt.