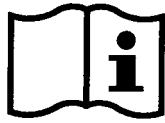


# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# Schistosoma mansoni IgG ELISA

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgG-class antibodies against *Schistosoma mansoni* in human serum or plasma



**DESCHG0410**



**96**

## 1. INTRODUCTION

---

Schistosomes belong to the class of distomas (trematodes). They rank among the most frequent pathogens. Estimations originate in more than 200 million affected people. The mature parasites are 6 – 22 mm long. The most important species are *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*. *Schistosoma mansoni* is common in Africa, South America and Middle East.

Schistosomiasis (bilharziosis) is – depending on species and location of the parasites – a disease of the intestine, liver and spleen resp. urinary passages. Humans are (re)infected by contact with fresh water which is contaminated by ova containing urine or faeces. If larvae bore into human skin, first a transient skin reaction appears (itch with exanthema or erythema, by repeatedly infection cercarial dermatitis is possible). After 3 - 10 weeks the meanwhile sexually mature worms synthesize cytotoxic and allergic substances which cause feverish reaction in humans (Katayama fever). The infected person is mostly harmed by the eggs, which get into organs via blood excreting proteins and glycoproteins. The person reacts under participation of own antibodies and immune complexes with formation of granuloma and granulomatous proliferation in intestine and urinary bladder mucosa. Not excreted eggs die after 3 weeks and will be dissolved or calcified. The affected tissue gets fibrous. In final stage bilharziosis will cause dead.

## 2. INTENDED USE

---

The Demeditec *Schistosoma mansoni* IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Schistosoma mansoni* in human serum or plasma (citrate).

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

---

The qualitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against *Schistosoma mansoni* is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with *Schistosoma mansoni* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled Protein A conjugate is added. This conjugate binds to antigen-antibody complexes. 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 *Schistosoma*-specific IgG antibodies in the specimen. Acidic solution 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

- **Schistosoma mansoni Coated Wells (IgG):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Schistosoma mansoni antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent** \*\*\*: 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml acidic solution, 0.4 N/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.
- **Protein A Conjugate**\*\* : 1 bottle containing 20 ml of peroxidase Protein A; coloured blue, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Schistosoma mansoni IgG Positive Control**\*\*\*: 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Schistosoma mansoni IgG Cut-off Control**\*\*\*: 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Schistosoma mansoni IgG 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
- 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 Schistosoma 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 °C; stability until expiry date.*

### 6.2. Protein A Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with Protein A, horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue 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. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until 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. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

### 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 0.4 N acidic 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 or plasma (citrate) 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 (-70...-20°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 IgG Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgG 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. The following test procedure is only validated for manual procedure. 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.*

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 Protein A 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 DU 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 Demeditec Units

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

*Example:  $\frac{1.204 \times 10}{0.38} = 32 \text{ DU (Demeditec Units)}$*

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

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean (DU)</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	4	0.76	5.7
<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean (E)</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	24	1.14	5.1

### 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 >95 %.

### 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 87 %.

### 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 0.2 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.

## 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:** Acidic solution 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.

## 1. EINLEITUNG

---

Schistosomen gehören zur Klasse der Saugwürmer (Trematodes); sie zählen zu den häufigsten Krankheitserregern. Schätzungen gehen davon aus, dass über 200 Mio. Menschen betroffen sind. Im ausgewachsenen Stadium sind die Parasiten 6 – 22 mm groß; zu den wichtigsten Arten zählen Schistosoma mansoni, S. japonicum und S. haematobium. Schistosoma mansoni ist in Afrika, Südamerika und im Nahen Osten verbreitet.

Schistosomiasis (Bilharziose) ist – abhängig von Art und Sitz der Parasiten – eine Erkrankung des Darmes, der Leber und der Milz bzw. der harnableitenden Wege. Der Mensch (re)infiziert sich durch Kontakt mit Süßwasser, das durch eihaltigen Harn oder Stuhl verseucht wurde. Wenn sich Larven (Zerkarien) in die menschliche Haut einbohren, kommt es zunächst zu vorübergehenden Hautreaktionen (Juckreiz mit Exanthem oder Erythem, bei wiederholter Infektion kann es zu einer Zerkariendermatitis kommen). Nach 3 – 10 Wochen bilden die mittlerweile geschlechtsreifen Würmer zytotoxische bzw. allergisch wirkende Substanzen, die beim Menschen (Endwirt) fieberhafte Reaktionen auslösen (Katayama-Syndrom). Im Wesentlichen wird der Infizierte aber durch die Eier geschädigt, die mit dem Blut in die Organe gelangen und Proteine und Glykoproteine ausscheiden: Der Mensch reagiert darauf unter Beteiligung eigener Antikörper und Immunkomplexe mit Granulombildung und granulomatösen Wucherungen in der Darm- bzw. Harnblasenwand. Nicht ausgeschiedene Eier sterben nach ca. 3 Wochen und werden dann aufgelöst oder verkalken. Davon betroffenes Gewebe verändert sich fibrös. Das Endstadium der Bilharziose führt zum Tod.

Nachweis:

- Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels ELISA, IFT, Hämagglutination

## 2. VERWENDUNGSZWECK

---

Der Demeditec Schistosoma mansoni IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Schistosoma mansoni in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

## 3. TESTPRINZIP

---

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Schistosoma mansoni beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Schistosoma mansoni spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertes Protein A bindet an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit saurer Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450nm gemessen werden kann.



## 4. MATERIALIEN

---

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Schistosoma beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Schistosoma Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer\*\*\*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml saurer Lösung, 0.4 N/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.
- **Protein A Konjugat\*\*:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugiertem Protein A; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Schistosoma mansoni IgG Positivkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Schistosoma mansoni IgG Cut-off Kontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Schistosoma mansoni IgG 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 Waschorruchtung
- 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 Schistosoma 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. Protein A Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von Protein A, Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen 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. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *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 0,4 N saure Lösung (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 Serum- oder Plasmaproben (Citrat) 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). Wiederaufgetaute 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 IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10 µl Probe und 1 ml IgG-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 Waschschritte 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.

- Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
- Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
- 1 h  $\pm$  5 min bei 37°C inkubieren.**
- 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!*

- 100µl Protein A Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
- 30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
- Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
- 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
- Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
- 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 IgG-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in DU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*

- 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: Extinktionswerte **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:*  $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

*Cut-off = 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 Demeditec-Einheiten [DU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{Demeditec-Einheiten} = \text{DU}]$

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

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

## 10. TESTMERKMALE

### 10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert (DU)	Vk (%)
Pos. Serum	4	0.76	5.7
Intraassay	n	Mittelwert (OD)	Vk (%)
Pos. Serum	24	1.14	5.1

### 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 beträgt >95 %.

### 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 87 %.

### 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 0,2 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.

## 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:** Saure Lösung 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.

**BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**

- Burkhardt, F. [Hrsg.]: Mikrobiologische Diagnostik. Thieme, Stuttgart, New York 1992. 9-452
- Hahn; Falke; Kaufmann; Ullmann [Hrsg.]: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, Berlin, Heidelberg 2001. 784ff.
- Jordan, P.; Webbe G.; Sturrock, F.: Human schistosomiasis. CAB International, Wallingford Oxon 1993.
- Lang, W.; Löscher, T. [Hrsg.]: In: Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Thieme, Stuttgart, New York 2000. 9-204
- [http://www.rki.de/INFEKT/STECKBRF/STBR\\_PA/PARASIT.HTM?/INFEKT/STECKBRF/STBR\\_PA/SC HISTO.HTM&1](http://www.rki.de/INFEKT/STECKBRF/STBR_PA/PARASIT.HTM?/INFEKT/STECKBRF/STBR_PA/SC HISTO.HTM&1)

**SCHEME OF THE ASSAY**






## Schistosoma mansoni IgG-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 <b>Incubate for 1 h at 37°C</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 30 min at room temperature</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

<b>Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos</b>	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
<b>IVD</b>	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
<b>LOT</b>	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
<b>CE</b>	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
<b>[REF]</b>	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
<b>MTP</b>	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
<b>CONJ</b>	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
<b>CONTROL -</b>	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo
<b>CONTROL +</b>	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
<b>CUT OFF</b>	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
<b>DIL G</b>	Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
<b>SUB TMB</b>	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB
<b>WASHBUF 20x</b>	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