Instructions for Use

Mycoplasma hominis IgM ELISA

IVD

REF EIA-4560

Σ 96

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1 INTRODUCTION 2
2 PRINCIPLE OF THE TEST 2
3 WARNINGS AND PRECAUTIONS 3
4 REAGENTS 4
5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 5
6 ASSAY PROCEDURE 5
7 RESULTS 7
8 QUALITY CONTROL 7
9 ASSAY CHARACTERISTICS 8
10 LIMITATIONS OF USE 8
11 LEGAL ASPECTS 9
12 REFERENCES / LITERATURE 9

1 EINLEITUNG 10
2 TESTPRINZIP 10
3 VORSICHTSMAßNAHMEN 10
4 BESTANDTEILE DES KITS 11
5 PROBENVORBEREITUNG 12
6 TESTDURCHFÜHRUNG 13
7 ERGEBNISSE 15
8 QUALITÄTSKONTROLLE 15
9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA 16
10 GRENZEN DES TESTES 16
11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN 17
12 REFERENZEN / LITERATUR 17

1 INTRODUZIONE 18
2 PRINCIPIO DEL TEST 18
3 PRECAUZIONI 18
4 COMPONENTI DEL KIT 19
5 CAMPIONI 20
6 ATTUAZIONE DEL TEST 21
7 RESULTATI 23
8 CONTROLLO QUALITÀ 23
9 CARATTERISTICHE DEL TEST 24
10 LIMITAZIONI 24
11 ASPETTI LEGALI 24
12 BIBLIOGRAFIA 24

SYMBOLS USED 25

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE 26

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG Mycoplasma hominis IgM Enzyme Immunoassay Kit** provides materials for the **qualitative** and **semiquantitative** determination of IgM-class antibodies to Mycoplasma hominis in serum and plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma).
This assay is intended for in vitro diagnostic use only.

1.2 Summary and Explanation

Mycoplasma hominis is a strain of bacteria present in the vagina. It is one of the many organisms that may cause pelvic inflammatory disease (PID) in women. PID comprises a spectrum of inflammatory disorders of the upper genital tract among women and may include any combination of endometritis, salpingitis, tubo-ovarian abscess, and/or pelvic peritonitis.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG Mycoplasma hominis IgM ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Patient samples are diluted with S*ample Diluent* and additionally incubated with *IgG-RF-Sorbent*, containing hyper-immune anti-human IgG-class antibody to eliminate competitive inhibition from specific IgG and to remove rheumatoid factors. This pretreatment avoids false negative or false positive results.
Microtiter wells as a solid phase are coated with Mycoplasma hominis surface antigen p120.
Diluted patient specimens and **ready-for-use controls** are pipetted into these wells. During incubation Mycoplasma hominis-specific antibodies of positive specimens and controls are bound to the immobilized antigens.
After a washing step to remove unbound sample and control material horseradish peroxidase conjugated anti-human IgM antibodies are dispensed into the wells. During a second incubation this anti-IgM conjugate binds specifically to IgM antibodies resulting in the formation of enzyme-linked immune complexes.
After a second washing step to remove unbound conjugate the immune complexes formed (in case of positive results) are detected by incubation with TMB substrate and development of a blue color. The blue color turns into yellow by stopping the enzymatic indicator reaction with sulfuric acid.
The intensity of this color is directly proportional to the amount of Mycoplasma hominis-specific IgM antibody in the patient specimen. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microtiter plate reader.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.2 mol/L H_2SO_4. It may cause skin irritation and burns.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets.
  Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. ***Microtiterwells***, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
   Wells coated with Mycoplasma hominis surface antigen p120.
   (incl. 1 strip holder and 1 cover foil)
2. ***Sample Diluent ****, 1 vial, 100 mL, ready to use;
   colored yellow; pH 7.2 ± 0.2.
3. ***IgG-RF-Sorbent ****, 1 vial, 6.5 mL, ready to use;
   colored yellow;
   Contains anti-human IgG-class antibody.
4. ***Pos. Control ****, 1 vial, 1.0 mL, ready to use;
   colored yellow, red cap.
5. ***Neg. Control ****, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;
   colored yellow, yellow cap.
6. ***Cut-off Control ****, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;
   colored yellow, black cap.
7. ***Enzyme Conjugate ****, 1 vial, 20 mL, ready to use,
   colored red,
   antibody to human IgM conjugated to horseradish peroxidase.
8. ***Substrate Solution***, 1 vial, 14 mL, ready to use,
   Tetramethylbenzidine (TMB).
9. ***Stop Solution***, 1 vial, 14 mL, ready to use,
   contains 0.2 mol/L H_2SO_4,
   Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. ***Wash Solution ****, 1 vial, 30 mL (20X concentrated for 600 mL), pH 6.5 ± 0.1
    see „Preparation of Reagents“.

* contain non-mercury preservative

4.1.1 Equipment and material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450/620 nm ±10 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Timer
- Absorbent paper

4.2 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.
Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.
Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.3 Reagent Preparation

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution
Dilute *Wash Solution* **1+19** (e.g. 10 mL + 190 mL) with fresh and germ free redistilled water. This diluted wash solution has a pH value of 7.2 ± 0.2.
Consumption: ~ 5 mL per determination.
Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. Be sure that the crystals are completely dissolved before use.
The diluted Wash Solution is stable for 4 weeks at 2 °C to 8 °C.

4.4 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

4.5 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.
Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.
Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:
Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:
Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 3 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.
Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

Prior to assaying each patient specimen is first to be diluted with *Sample Diluent*. For the absorption of rheumatoid factor these prediluted samples then have to be incubated with *IgG-RF-Sorbent*

1. Dilute each patient specimen **1+50** with *Sample Diluent*;
   e.g. 10 µL of specimen + 0.5 mL of *Sample Diluent*. **Mix well.**
2. Mix well the *IgG-RF-Sorbent* before use.
3. Dilute this prediluted sample **1+1** with *IgG-RF-Sorbent*
   e.g. 60 µL prediluted sample + 60 µL *IgG-RF-Sorbent*. **Mix well**
4. **Let stand at room temperature for at least 15 minutes, up to a maximum of 2 hours and mix well again.**
5. Take 100 µL of these pretreated samples for the ELISA.

Please note: Controls are ready for use and must not be diluted!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- **It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature before starting the test run!**
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- During 37 °C incubation cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.

6.2 Test Procedure

Prior to commencing the assay, dilute *Wash Solution*, **prepare patient samples as described in point 5.3** and establish carefully the **distribution and identification plan** supplied in the kit for all specimens and controls.

1. 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 *Neg. Control,*
   2 wells (e.g. C1+D1) for the *Cut-off Control* and
   1 well (e.g. E1) for the *Pos. Control*.

   It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate.

2. Dispense
   100 µL of *Neg. Control* into well B1
   100 µL of *Cut-off Control* into wells C1 and D1
   100 µL of *Pos. Control* into well E1 and
   100 µL of each p r e a t r e a t e d sample <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
   Leave well A1 for substrate blank!

3. Cover wells with foil supplied in the kit. Incubate for **60 minutes at <u>room temperature</u> (20 °C to 25 °C).**

4. Briskly shake out the contents of the wells.
   Rinse the wells 5 times with diluted *Wash Solution* (**300 µL per well**). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
   Important note:
   The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

5. Dispense **100 µL** *Enzyme Conjugate* into each well, **except A1**.

6. Incubate for **30 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C).**
   Do not expose to direct sun light!

7. Briskly shake out the contents of the wells.
   Rinse the wells 5 times with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

8. Add **100 µL** of *Substrate Solution* <u>into all</u> wells.

9. Incubate for **exactly 15 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C) in the dark**.

10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.
    Any blue color developed during the incubation turns into yellow.
    Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen!

11. Read the optical density at **450/620 nm** with a microtiter plate reader **within 30 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Measurement

Adjust the ELISA microplate or microstrip 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.
<u>Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.</u>
Where applicable **calculate the mean absorbance values** of all duplicates.

7 RESULTS

7.1 Validation of the Test Run

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

Substrate blank in A1:	Absorbance value **lower than 0.100**.
***Neg. Control* in B1:**	Absorbance value **lower than 0.200**.
***Cut-off Control* in C1/D1:**	Absorbance value **between 0.350 – 0.850**
***Pos. Control* in E1**	Absorbance value **between 0.650 – 3.000**

7.2 Calculation

Mean absorbance value of Cut-off Control [CO]

Calculate the mean absorbance value of the two (2) Cut-off Control determinations (e.g. in C1/D1).

Example: *(0.44 + 0.46)/2 = 0.45 = CO*

7.3 Interpretation

POSITIVE Patient (mean) absorbance values more than 10 % above CO
(Mean OD patient > 1.1 × CO)

GREY ZONE Patient (mean) absorbance values from 10 % above to 10 % below CO
repeat test 2 - 4 weeks later - with new patient samples
(0.9 × CO ≤ Mean OD patient ≤ 1.1 × CO)
Results in the second test again in the grey zone ⇒ **NEGATIVE**

NEGATIVE Patient (mean) absorbance values more than 10 % below CO
(Mean OD patient < 0.9 × CO)

7.3.1 Results in DRG Units [DU]

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{CO}} = \text{[DRG Units = DU]}$$

Example: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35$ DU

Interpretation of Results

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

8 QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.
It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.
If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.
In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.
After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Specificity of Antigen

The plates of Mycoplasma hominis IgM ELISA are coated with Mycoplasma hominis surface antigen p120. This antigen shows no cross-reactivity with M.genitalium, M.fermentas and Ureaplasma urealyticum.

9.2 Diagnostic Specificity & Sensitivity

The diagnostic Specificity and Sensitivity was defined for the DRG Mycoplasma hominis IgM ELISA by measuring 456 samples in total:

	total	**positive**		**grey zone**		**negative**	
	Σ	**Σ**	**%**	**Σ**	**%**	**Σ**	**%**
Blood bank samples:	**364**	**17**	**4,7**	**3**	**0,8**	**344**	**94,5**
(potential healthy referring to M.hominis), therefrom:							
Individuals (15-60 years old):	168	10	6,0	0	0	158	94
Pregnant women:	48	0	0	0	0	48	100
Samples from Elderly:	70	5	7,1	0	0	65	92,9
Cancer patients:	78	2	2,6	3	4	73	93,6
QC samples:	**92**	**5**		**0**		**87**	

Specificity is 99.31%.

Sensitivity is 100%

10 LIMITATIONS OF USE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.
The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. 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.
Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.
The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.
Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.
Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

Detection of Mycoplasma hominis antibodies by three different techniques, application to women with pelvic inflammatory disease. Constans J, Poutiers F, Renaudin H, Leng JJ, Bebear C. Ann Biol Clin (Paris) 1991; 49(6):351-8
Measurement of antibody to Mycoplasma hominis by an enzyme-linked immunoassay and detection of class-specific antibody responses in women with postpartum fever. Brown MB, Cassell GH, McCormack WM, Davis JK. Am J Obstet Gynecol. 1987 Mar; 156(3):701-8

1 EINLEITUNG

Der **DRG Mycoplasma hominis IgM ELISA** wird zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Mycoplasma hominis in Humanserum und Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der **DRG Mycoplasma hominis IgM ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay.

In einem dem Testablauf vorangehenden vorbereitenden Schritt werden die Patientenproben mit *Sample Diluent* verdünnt und zusätzlich mit *IgG-RF-Sorbent* inkubiert.
Durch die Verwendung von Anti-human-IgG-Antikörpern im *IgG-RF-Sorbent* werden gleichzeitig hemmende kompetitive Bindungen durch spezifische IgG-Antikörper und Rheumafaktoren verhindert.
Diese Probenvorbehandlung verhindert falsch positive oder negative Ergebnisse.

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit Mycoplasma hominis Surface Antigen p120 beschichtet. In diese Vertiefungen werden **verdünnte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert.

Während der darauf folgenden Inkubation werden Mycoplasma hominis-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden.

Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-IgM-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgM-Antikörper bindet und dadurch zur Bildung enzymmarkierter Immunkomplexe führt.

Durch einen zweiten Waschvorgang wird ungebundenes Konjugat entfernt.

Die (bei positiven Resultaten) gebildeten Immunkomplexe werden durch Inkubation mit TMB-Substrat anhand einer blauen Farbreaktion, die nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure in gelb umschlägt, sicht- und messbar gemacht.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Anti-Mycoplasma hominis-Antikörpermenge in der Patientenprobe direkt proportional.

Die Extinktionsmessung bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,2 mol/L H_2SO_4 enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen den EU-Verordnungen.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. ***Microtiterwells***, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
   Mit Mycoplasma hominis Surface Antigen p120 beschichtet;
   (inkl. 1 Streifenhalter und 1 Abdeckfolie)
2. ***Sample Diluent* *** (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig;
   gelb gefärbt; pH 7,2 ± 0,2
3. ***IgG-RF-Sorbent* *,** 1 Fläschchen, 6.5 mL, gebrauchsfertig,
   gelb gefärbt;
   Enthält Anti-human-IgG.
4. ***Pos. Control* *** (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 1,0 mL, gebrauchsfertig;
   gelb gefärbt, rote Kappe.
5. ***Neg. Control* *** (Negative Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;
   gelb gefärbt, gelbe Kappe.
6. ***Cut-off Control* *** (Grenzwert-Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;
   gelb gefärbt, schwarze Kappe.
7. ***Enzyme Conjugate* *** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;
   rot gefärbt,.
   Antikörper gegen humanes IgM, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
8. ***Substrate Solution*** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
   Tetramethylbenzidin (TMB).
9. ***Stop Solution*** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
   enthält 0,2 M H_2SO_4;
   Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
10. ***Wash Solution* *** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, (**20X** konzentriert für 600 mL) pH 6,5 ± 0,1;
    Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter, (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Vortex-Mischer
- Aqua dest.
- Kurzzeitwecker
- Saugfähiges Papier

4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.
Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
Die *Microtiterwells* sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.
Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.
Wash Solution
Waschlösung **1+19** (z.B. 10 mL + 190 mL) mit frischem, keimfreiem destilliertem Wasser verdünnen. Diese verdünnte Waschlösung hat einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2.
Bedarf: ca. 5 mL pro Bestimmung.
Kristalle in der Lösung durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C auflösen. Es muss sichergestellt sein, dass die Kristalle vollständig gelöst sind, bevor die Waschlösung verwendet wird.
Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C bis 8 °C für 2 Wochen stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen zu diesem Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

4.5 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.
Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:
Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:
Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulanz enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 3 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren, bei -20 °C, bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Vor Testbeginn werden die Patientenproben zuerst mit *Sample Diluent* verdünnt. Anschließend werden diese vorverdünnten Proben mit *IgG-RF-Sorbent* inkubiert um Rheumafaktoren zu eliminieren.

1. Jede Patientenprobe **1+50** mit *Sample Diluent verdünnen*;
   z.B. 10 µL Probe + 0.5 mL of *Sample Diluent.* **Gut mischen.**
2. Vor Gebrauch das IgG-RF-Sorbent gut mischen.
3. Die vorverdünnte Probe **1+1** mit *IgG-RF-Sorbent* verdünnen
   z.B. 60 µL vorverdünnte Probe + 60 µL *IgG-RF-Sorbent*. **Gut mischen.**
4. **Mindestens 15 Minuten, bis maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen und danach nochmals gut mischen.**
5. 100 µL dieser vorverdünnten Probe werden in den ELISA eingesetzt.

Achtung: Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien, Proben und Kontrollen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen!
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Nach Anbruch des Testkits und anschließender Lagerung die Konjugat- und Kontroll-Fläschchen vor der Weiterverwendung auf eventuelle mikrobielle Kontamination hin prüfen.
- Die Patientenproben bzw. das Konjugat sorgfältig auf den Boden der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren (ohne den Rand zu benetzen!), um Kreuzkontaminationen und fälschlich erhöhte Ergebnisse zu vermeiden.
- *Microtiterwells* während der 37 °C Inkubation durch Abdecken mit Abdeckfolie vor Verdunstung schützen.

6.2 Testdurchführung

Vor Beginn der Testdurchführung die *Wash Solution* verdünnen, die **Patientenproben vorbereiten, wie unter Punkt 5.3 beschrieben** und auf dem mitgelieferten **Übersichtsplan** die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen zur sicheren Identifizierung genau festlegen.

1. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen in den Streifenhalter einsetzen.

   Hierbei mindestens
   1 Vertiefung (z.B. A1) für den Substratleerwert (Blank),
   1 Vertiefung (z.B. B1) für die *Neg. Control*
   2 Vertiefungen (z.B. C1 + D1) für die *Cut-off Control* und
   1 Vertiefung (z.B. E1) für die *Pos. Control* vorsehen.

   Es bleibt dem Anwender überlassen, zur höheren Sicherheit für die Kontrollen und die Patientenproben Doppel- oder Mehrfachbestimmungen vorzusehen.

2. **100 µL** *Neg. Control* in Vertiefung B1 je
   100 µL *Cut-off Control* in die Vertiefungen C1 und D1
   100 µL *Pos. Control* in Vertiefung E1 und
   100 µL jeder v o r b e h a n d e l t e n Patientenprobe <u>mit neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Wells pipettieren.
   Vertiefung A1 für den Substratleerwert (Blank) reservieren!

3. Die Mikrotiterstreifen mit der dem Testkit beiliegenden Folie abdecken.
   60 Minuten bei <u>Raumtemperatur</u> (20 °C bis 25 °C) inkubieren.

4. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
   Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Testes wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!

5. **100 µL** *Enzyme-Conjugate* in jede Vertiefung geben, **außer in A1**.

6. Die Mikrotiterstreifen **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C)** inkubieren.
   Testansatz nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!

7. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.

8. **100 µL** *Substrate Solution* <u>in jede</u> Vertiefung geben.

9. Die Mikrotiterstreifen **15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) im Dunkeln** inkubieren

10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL** *Stop Solution* in jede Vertiefung abstoppen.
    Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
    Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen!

11. Die Optische Dichte bei **450/620 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **30 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Messung

Mit Hilfe des **Substratleerwertes (Blank) in A1 den Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.
Falls diese Kalibrierung 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 Vertiefungen bei 450 nm messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in den Übersichtsplan eintragen.
<u>Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.</u>
Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den Mittelwert der Extinktionswerte berechnen.

7 ERGEBNISSE

7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Substrat-Leerwert in A1:	Extinktion **niedriger als 0,100**
***Neg. Control* in B1:**	Extinktion **niedriger als 0,200**
***Cut-off Control* in C1 und D1:**	Extinktionen **zwischen 0,350 und 0,850**
***Pos. Control* in E1:**	Extinktion **zwischen 0,650 und 3,000**

7.2 Testauswertung

Extinktionsmittelwert der Grenzwert-Kontrolle (*Cut-off Control*) [CO]
Den Extinktionsmittelwert der 2 Grenzwert-Kontroll-Bestimmungen (z.B. in C1/D1) berechnen.
Beispiel: *(0.44 + 0.46)/ 2 = 0.45 = CO*

7.3 Interpretation

POSITIV Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10% oberhalb des CO.
(Mittlere OD Probe > 1.1 × CO)

GRAUZONE Patienten-Extinktions(mittel)werte von 10 % oberhalb bis zu 10 % unterhalb des CO.
Test 2 - 4 Wochen später wiederholen - mit frischer Patientenprobe.
(0.9 × CO ≤ Mittlere OD Probe ≤ 1.1 × CO)
Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone ⇒ **NEGATIV.**

NEGATIV Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10 % unterhalb des CO
(Mittlere OD Probe < 0.9 × CO)

7.3.1 Ergebnisse in DRG Units [DU]

$$\frac{\text{Patienten-Extinktions(mittel)wert} \times 10}{\text{CO}} = \text{[DRG Units = DU]}$$

Beispiel: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35$ DU

Interpretation der Ergebnisse

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

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.
Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.
Wenn die Ergebnisse des Testes nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.
In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.
Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Spezifität des Antigens

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden beschichtet mit Mycoplasma hominis Surface Antigen p120. Dieses Antigen zeigt keine Kreuzreaktivität zu M.genitalium, M.fermentas und Ureaplasma urealyticum.

9.2 Diagnostische Spezifität & Sensitivität

Die diagnostische Spezifität und Sensitivität wurde für den DRG Mycoplasma hominis IgM ELISA definiert durch Evaluierung von 456 Proben:

	Total	**Positiv**		**Graubereich**		**Negativ**	
	Σ	**Σ**	**%**	**Σ**	**%**	**Σ**	**%**
Blutbank Proben: (potenziell gesund in Bezug auf M.hominis),	**364**	**17**	**4,7**	**3**	**0,8**	**344**	**94,5**
davon:							
Individuen (15 – 60 Jahre):	168	10	6,0	0	0	158	94
Schwangere:	48	0	0	0	0	48	100
Ältere (> 60 Jahre):	70	5	7,1	0	0	65	92,9
Krebspatienten:	78	2	2,6	3	4	73	93,6
QC Proben:	**92**	**5**		**0**		**87**	

Die Spezifität beträgt 99,31%.

Die Sensitivität beträgt 100%.

10 GRENZEN DES TESTES

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.
Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.
Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.
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.
Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.
Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.
Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

L'immunoassay enzimatico DRG Mycoplasma hominis IgM fornisce materiale per la determinazione **qualitativa** e **semiquantitativa** di anticorpi della classe IgM per Mycoplasma hominis nel siero e plasma (EDTA-, eparina- or citrate plasma).
Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit **DRG Mycoplasma hominis IgM ELISA** è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati.
Micropozzetti come fase solida sono ricoperti con l'anitgene Mycoplasma hominis.
I campioni dei pazienti sono diluiti con il *Sample Diluent* e poi incubati con *IgG-RF-Sorbent*,
contenente anticorpi IgG anti-umani ed iper-immuni per eliminare l'inibizione competitiva da parte di IgG specifici e per rimuovere fattori reumatici.
Questo pre-trattamento evita dei risultati falsamente positivi o negativi.
Campioni diluiti di pazienti e **controlli pronti all'uso** sono pipettati in questi micropozzetti.
Durante l'incubazione gli anticorpi specicifi contro Mycoplasma hominis di campioni positivi e die controlli si legano agli antigeni immobilizzati. Dopo i passaggi di lavaggio per rimuovere materiali dei campioni e controlli non legati, anticorpi anti-IgM umano coniugati alla perossidasi di rafano sono aggiunti ai pozzetti.
Durante una seconda incubazione questi coniugati anti-IgM si legano in maniera specifica agli IgM anticorpi, risultando nella formazione di complessi immunologici-enzimatici.
Dopo un secondo passaggio di lavaggio per rimuovere coniugati non legati, i complessi immunologici formati (nel caso di risultati positivi) sono evidenziati dalla incubazione del substrato TMB e da conseguente sviluppo di un colore blu. Il colore blu vira nel giallo dopo l'arresto della reazione enzimatica indicatore con acido sulfidrico.
L'intensità di questo colore è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo IgM Mycoplasma hominis-specifico nel campione del paziente. L'assorbanza a 450 nm viene determinata con un spettrofotometro ELISA per micropozzetti.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.2 mol/L H_2SO_4. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicchè le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. ***Microtiterwells*** (Micropozetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti
   Pozzetti ricoperti con Mycoplasma hominis surface antigene p120,
   (include 1 supporto per pozzetti e 1 fogli di copertura)
2. ***Sample Diluent **** (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso,
   colore giallo; pH 7.2 ± 0.2.
3. ***IgG-RF-Sorbent*** (Assorbente IgG-RF)*, 1 flacone, 6.5 mL, pronto all'uso,
   colorato giallo;
   Contiene anticorpi della class IgG anti-umano.
4. ***Pos. Control **** (Controllo positivo), 1 flacone, 1.0 mL, pronto all'uso;
   colore giallo, tappo rosso.
5. ***Neg. Control **** (Controllo negativo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;
   colore giallo, tappo giallo.
6. ***Cut-off Control **** (Controllo valore limite), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;
   colore giallo, tappo nero.
7. ***Enzyme Coniugate **** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso;
   colore rosso,
   anticorpo a IgM umano coniugato alla perossidasi di rafano.
8. ***Substrate Solution*** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
   TMB (benzidine tetrametilico).
9. ***Stop Solution*** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
   contiene 0.2 mol/L H_2SO_4
   Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
10. ***Wash Solution **** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (20 X concentrato per 600 mL), pH 6.5 ± 0.1
    vedi „Preparazione dei reagenti".

* Contiene conservante senza mercurio

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette di precisione variabili, calibrati
- Incubatore a 37 °C
- Materiale per il lavaggio automatico o manuale
- Agitatore vortex
- Acqua deionizzata o (al momento) distillata
- Cronometro
- Carta assorbente

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.
Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C.
Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.
Test kit aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati come descritto sopra.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution
Diluire la *Wash Solution* **1 + 19** (p.es. 10 mL + 190 mL) con acqua sterile ridistillata.
Il valore pH in base a diluizione è 7,2 ± 0,2.
Consumo: ~ 5 mL per determinazione.
I cristalli nella soluzione si sciolgono durante il riscaldamento a 37 °C in bagnomaria. Assicurarsi che i cristalli siano completamente dissoluti prima dell'uso.
La Wash Solution diluita è stabile per 4 settimane a 2 °C a 8 °C.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino ala soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test.
Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.
Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:
Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.
Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:
Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 3 giorno a 2 °C a 8 °C prima dell'utilizzo.
Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi.
Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Prima dell'analisi ogni campione deve essere diluiti con il Diluente dei campioni (*Sample Diluent).* Per assicurare l'assorbimento di fattori reumatici, questi campioni pre-diluiti devono essere incubati con l'assorbente IgG RF (*IgG-RF-Sorbent).*

1. Diluire ogni campione dei pazienti **1 + 50** con il *Sample Diluent;*
   p.es. 10 µL di campione + 0.5 mL del *Sample Diluent.* **Agitare bene**.
2. Agitare bene IgG-RF-Sorbent prima dell'uso.
3. Diluire questi campioni pre-diluiti **1 + 1** con *IgG-RF-Sorbent*
   p.es. 60 µL campione prediluito + 60 µL *IgG-RF-Sorbent.* **Agitare bene**
4. **Lasciare riposare a temperatura ambiente per almeno 15 minuti, fino ad un massimo di 2 ore e mescolare bene.**
5. Prendere 100 µL di questi campioni pretrattati per l'ELISA.

Nota bene: Controlli sono pronti all'uso e non devono essere diluiti!

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- È molto importante portare tutti i reagenti, campioni e controlli a temperatura ambiente prima dell'eseguimento del test!
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
- Dopo la prima apertura e il seguente magazzinaggio controllare il tracciante e i controlli per contaminati microbici prima dell'ulteriore uso.
- Per evitare contaminazioni incrociati e risultati falsi pipettare i campioni e il tracciante sul fondo del pozzetto.
- Durante l'incubazione coprire i pozzetti per evitare l'evaporazione.

6.2 Eseguimento del test

Prima d'iniziare con il test **i campioni dei pazienti da preparare com'e descritto del punto 5.3** e diluire la *Wash Solution* e si dovrebbe eseguire un piano di distribuzione ed identificazione per tutti i campioni e controlli sul prestampato fornito nel kit.

1. Selezionare il numero richiesto di strips o pozzetti e inserirli sul sostegno.

   Si prega di collocare almeno:
   1 pozzetto (p.es. A1) per il bianco,
   1 pozzetto (p.es. B1) per il *Neg. Control*
   2 pozzetti (p.es. C1 D1) per il *Neg. Control* e
   1 pozzetto (p.es. D1) per il *Pos. Control*.

   È lasciato all'operator di determinare i controlli e i campioni in doppio.

2. Aggiungere
   100 µL del *Neg. Control* nei pozzetto B1
   100 µL del *Cut-off Control* nei pozzetti C1 + D1
   100 µL del *Pos. Control* nel pozzetto E1 e
   100 µL di ogni campione p r e t r a t t a t i con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.
   Lasciare il pozzetto A1 vuoto per il bianco!

3. Coprire i pozzetti con la foglia fornita nel kit. Incubare per **60 minuti a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C).**

4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
   Lavare i pozzetti 5 volte con *Wash Solution* diluita (**300 µL in ogni pozzetto**). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
   Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguimento del lavaggio!

5. Aggiungere **100 µL** del *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto, **eccetto A1**.

6. Incubare per **30 minuti a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)**.
   Non esporre alla luce solare diretta!

7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
   Lavare i pozzetti 5 volte con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.

8. Aggiungere **100 µL** di *Substrate Solution* in ogni pozzetti.

9. Incubare per **15 minuti esattamente a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) al buio**.

10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della *Stop Solution* in ogni pozzetto.
    Il colore blu sviluppato vira al giallo.
    Nota: Nei campioni fortemente positivi si può formare un precipitato scuro del cromogeno!

11. Determinare la densità ottica a **450/620 nm** con un fotometro **entro 30 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Misure fotometriche

Azzerare lo strumento ELISA per micropiastre utilizzando il **bianco nel pozzetto A1**.
Se per motivi tecnici il fotometro ELISA non può essere azzerato utilizzando il bianco nel pozzetto A1, si deve sottrarre l'assorbanza il valore del pozzetto A1 da tutti gli altri valor misurati per ottenere risultati reali!
Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti **a 450 nm** e riportare i valori di tutti i campioni e controlli del piano di distribuzione ed identificazione.
Determinazione a doppio raggio usando 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento è raccomandabile.
Dove possibile calcolare **il valore medio die valori di assorbanza** per tutti i campioni in doppio.

7 RESULTATI

7.1 Convalidazione del test

Il test può essere considerato valido se i seguenti criteri sono realizzati:

Valor bianco in A1:	Assorbanza **inferiore a 0.100**
***Neg. Control* in B1**:	Assorbanza **inferiore a 0.200**
***Cut-off Control* in C1/D1:**	Valor di assorbanza **tra 0.350 - 0.850**
***Pos. Control* in E1**:	Valor di assorbanza **tra 0.650 – 3.000**

7.2 Calcolo

Il valore medio del Controllo valore limite [CO]
Calcolare il valore medio di assorbanza dei due (2) Controlli valore limite (p.es. In C1/D1).
Esempio: *(0.44 + 0.46)/2 = 0.45 = CO*

7.3 Interpretazione

POSITIVI Valori (medi) di assorbanza dei pazienti almeno 10 % sopra il CO
(Medio DOpaziente > 1.1 × CO)

ZONA GRIGIA Valori (medi) di assorbanza da 10 % sopra a 10 % sotto il valore CO
ripetere il test 2-4 settimane dopo - con nuovi campioni dei pazienti.
(0.9 x CO ≤ DO mediopaziente ≤ 1.1 × CO)
Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia ⇒ **NEGATIVI**

NEGATIVI Valori (medi) di assorbanza almeno 10 % inferiore a CO
(Medio DOpaziente < 0.9 × CO)

7.3.1 Risultati in unità DRG [DU]

$$\frac{\text{valori (medi) di assorbanza dei pazienti} \times 10}{\text{CO}} = \text{[DRG Units = DU]}$$

Esempio: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35$ DU

Interpretazione dei risultati

Valore di soglia:	10	DU
Zona grigia:	9 - 11	DU
Negativi:	< 9	DU
Positivi:	> 11	DU

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge.
Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno.
Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.
È consigliabile di utilizzare programmi di valutazione di qualità nazionali o internazionali per assicurarsi la precisione di risultati.
Se i risultati del test non entrano nel campo dei controlli stabiliti, i risultati dei campioni dei pazienti dovrebbero essere considerati invalidi.
In questo caso si prega di controllare i seguenti parametri tecnici: calibrazione delle micropipette e dei cronometri; spettrofotometro, date di scadenze dei reagenti, magazzinaggio e condizione di incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.
Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Specificità degli anticorpi

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.2 Specificità diagnostica

E' 99.31%.
(Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.)

9.3 Sensitività diagnostica

E' 100%.
(Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.)

10 LIMITAZIONI

Contaminazioni batteriche o ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni possono influenzare i valori di assorbanza.
Per pazienti immunosoppressi e per neonati i dati sierologici hanno una validità ristretta.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.
I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1.
La diagnosi di una malattia infettiva non dovrebbe essere fondata sulla base di un solo risultato del test. La diagnosi precisa dovrebbe considerare la storia clinica, la simptomatologia e i dati sierologici.
Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.
Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.
Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.
Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2.
Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Francais	Espanol	Italiano
CE	European Conformity	CE-Konfirmitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
Σ	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits-datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
Microtiterwells	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
Enzyme Conjugate	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
Substrate Solution	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
Stop Solution	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d´ arresto
Zero Standard	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
Standard	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
Control	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
Pos. Control	Positive Control	Positive Kontrolle	Positif Contrôle	Control positivo	Controllo positivo
Neg. Control	Negative Control	Negative Kontrolle	Négatif Contrôle	Control negativo	Controllo negativo
Cut-off Control	Cut-off Control	Grenzwert-Kontrolle	Valeur limite Contrôle	Control valor limite	Controllo valore limite
Wash Solution	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
Sample Diluent	Sample Diluent	Probenverdünnungs-medium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluente dei campioni
Conjugate Diluent	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs-medium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluente del tracciante

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use.
	Leave well A1 for substrate Blank. Dispense 100 µl of Controls into appropriate wells.
	Dispense 100 µl of sample into selected wells.
60 min	Cover wells with foil. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
	Briskly shake out the contents of the wells.
	Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µl per well).
	Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
	Dispense 100 µl of Enzyme-Conjugate into each well.
30 min	Incubate for **30 minutes** at room temperature.
	Briskly shake out the contents of the wells.
	Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µl per well).
	Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
	Add 100 µl of Substrate Solution to each well.
15 min	Incubate for **15 minutes** at room temperature.
	Stop the reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
	Determine the absorbance of each well at 450 nm.