

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Mycobacterium tuber- culosis IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgM antibodies against Mycobacterium tuberculosis in serum and plasma.



DETUB03



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. INTENDED USE..... | 3 |
| 2. GENERAL INFORMATION | 3 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TESTS..... | 3 |
| 4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS..... | 4 |
| 5. REAGENTS PROVIDED | 4 |
| 6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED | 5 |
| 7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING | 6 |
| 8. ASSAY PROCEDURE..... | 6 |
| 9. EVALUATION..... | 7 |
| 10. ASSAY CHARACTERISTICS | 8 |
| 11. REFERENCES | 8 |
| | |
| 1. VERWENDUNGSZWECK..... | 9 |
| 2. KLINISCHE BEDEUTUNG | 9 |
| 3. TESTPRINZIP | 9 |
| 4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN..... | 10 |
| 5. INHALT DES TESTBESTECKS..... | 10 |
| 6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL..... | 11 |
| 7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN..... | 12 |
| 8. TESTDURCHFÜHRUNG | 12 |
| 9. AUSWERTUNG..... | 13 |
| 10. TESTCHARAKTERISTIKA..... | 14 |
| 11. LITERATUR..... | 14 |
| | |
| SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 16 |

1. INTENDED USE

The Mycobacterium tuberculosis IgM antibody ELISA kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgM antibodies against Mycobacterium tuberculosis in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Mycobacterioses (tuberculosis, leprosy, atypical mycobacterioses, paratuberculosis, and perhaps Crohn's Disease) are the infectious diseases of men and animals with the largest diffusion on earth. The infectious agents of tuberculosis are acid-resistant rod-like formed bacteria of the family Mycobacteriaceae, genus Mycobacterium. The germ was detected by Robert Koch in 1882. Owing to the very high infectious power of pathogenic mycobacteria, early diagnosis is essential to prevent spreading of the disease. Convergence of various approaches are necessary to control the mycobacterioses, immune reactions and bacterial shedding being variable during the diseases. However, usual diagnostic procedures were up to now unsatisfactory and did not allow to distinguish among different mycobacterial species. The illness is normally transferred by droplets of saliva from infected persons. The target of the infection are mostly the lungs, but also other organs like the brain, intestinal tract, bones, lymph nodes and kidneys can be afflicted. Tuberculosis is not only found in developing countries with 8 million of new infections yearly, but also in industrialized civilizations, as an actual disease with some thousands of cases yearly. Without treatment, the disease leads in 50% of the cases to death within less than two years. Clinical symptoms are fatigue, loss of weight, lack of appetite, light fever, nocturnal sweat and pain in the chest. Especially patients with HIV are threatened by tuberculosis due to their impaired immune system. A vaccination with living attenuated bacteria is possible (BCG = Bacille Calmette Guérin). This is mostly done with newborn or young children. With older patients, before the vaccination there is normally performed the tuberculin test (Pirquet or Mantoux), where a small amount of tuberculin is injected under the skin. In a positive case, there exist antibodies against Mycobacteria, and a vaccination is not necessary. Up to recently, there have not existed any serological methods to detect tuberculosis antibodies in serum. The only available procedure was besides the skin tuberculin test the direct microscopical identification of the dyed bacteria in sputum. Meanwhile specific antigens have been prepared either by purification of natural material or by recombinant methods. This ELISA test kit for the determination of IgM antibodies uses a cocktail of highly pure proteins in order to determine an immune response against the bacteria in human serum.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Mycobacterium tuberculosis IgM antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Mycobacterium tuberculosis antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgM antibodies of the serum and the immobilized Mycobacterium tuberculosis antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgM peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of IgM antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

| Symbol | Components | Volume / Qty. |
|--|---|---------------|
| SORB MT | Mycobacterium tuberculosis antigen coated microtiter strips | 12 |
| CAL A | Calibrator A (Negative Control) | 2 mL |
| CAL B | Calibrator B (Cut-Off Standard) | 2 mL |
| CAL C | Calibrator C (Weak Positive Control) | 2 mL |
| CAL D | Calibrator D (Positive Control) | 2 mL |
| ENZ CONJ | Enzyme Conjugate | 15 mL |
| SUB TMB | Substrate | 15 mL |
| STOP SOLN | Stop Solution | 15 mL |
| SAM DIL | Sample Diluent | 60 mL |
| WASH SOLN 10x | Washing Buffer (10x) | 60 mL |

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with M. tuberculosis antigen mixture (recombinant Mycobacterium tuberculosis antigens, with 18, 36 and 40 kDa). Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgM antibodies against Mycobacterium tuberculosis. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgM antibodies against Mycobacterium tuberculosis. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgM antibodies against Mycobacterium tuberculosis. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgM antibodies against Mycobacterium tuberculosis. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgM-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L Proclin™. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Reuseable Plastic Bag for the dry storage of non-used strips
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

| | OD Value | Corrected OD |
|-----------------------|----------|--------------|
| Substrate Blank | 0.014 | |
| Negative Control | 0.025 | 0.011 |
| Cut-Off Standard | 0.579 | 0.565 |
| Weak Positive Control | 1.108 | 1.094 |
| Positive Control | 1.851 | 1.837 |

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of +/-20 % around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Mycobacterium tuberculosis IgM antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of +/-20% around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

For doubtful IgM positive results and for the confirmation of positive reactions the absorption of Rheumatoid Factor should be conducted with an appropriate reagent (Cat. No. DEMJS02, RF-Adsorbent).

9.3. Interpretation

Although antibody responses may occur in healthy persons in rare cases, normally they indicate a colonisation with Mycobacterium tuberculosis. Positive IgM results are related to the early stage of an infection. During its course a seroconversion towards IgG antibodies takes place. The simultaneous presence of IgG and IgM antibodies denote an infection at its early stage or a reactivation in chronic infections. The sole occurrence of IgG is a sign for a completed immunological response. IgA antibodies occur after the initial activation of the immunoreaction as indicated by the presence of IgM and are associated to a high inflammatory potential. Since they are not as affected by anergy effects as IgG antibodies, they are a useful marker for patients which show a reduced IgG response due a pre-existing immune depression.

Briefly the humoral immune response can be summarized as follows:

- IgM (-), IgG (-), IgA (-): no infection
- IgM (+), IgG (-), IgA (-): infection at a very early stage
- IgM (-), IgG (+), IgA (+/-): completed infection
- IgM (+), IgG (+), IgA (+/-): infection at an early stage or re-infection
- IgM (-), IgG (-), IgA (+): completed infection in patients suffering from IgG reducing effects

10. ASSAY CHARACTERISTICS

| Mycobacterium ELISA | IgM |
|------------------------|---|
| Intra-Assay-Precision | 7.9 % |
| Inter-Assay-Precision | 7.4 % |
| Inter-Lot-Precision | 5.7 – 8.9 % |
| Analytical Sensitivity | 1.22 U/mL |
| Recovery | 87 – 91 % |
| Linearity | 78 – 118 % |
| Cross-Reactivity | No cross-reactivity to <i>Helicobacter pylori</i> and <i>Bordetella pertussis</i> . |
| Interferences | No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL |
| Clinical Specificity | 100 % |
| Clinical Sensitivity | 100 % |

11. REFERENCES

1. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 1992, 257:1055-64.
2. Kochi A. Global tuberculosis situation and the control strategy of the WHO. *Tubercle*, 1991, 72:1-6.
3. Marks LG. Genetics of tuberculosis. *Medical clinics of North America*, 1993, 77(6):1219-33.
4. Aziz A, Siddiqui SH, Ishaq M. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* from treated patients in Pakistan. *Tubercle*, 1989, 70:45-51.
5. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis Texas, California and Pennsylvania. *Morbidity and mortality weekly report*, 1990, 39:369-72.
6. TB morbidity United States, 1995. *Morbidity and mortality weekly report*, 1996, 45:365-70.
7. Barnes PF, Lee HQ, Davidson PT. Tuberculosis in patients with HIV infection. *Medical clinics of North America*, 1993, 77(6):1369-89.
8. Directorate-General for Chest Diseases. Tuberculosis control guide. Egypt, National Tuberculosis Control Programme, Ministry of Health, November 1994.
9. Snider DE Jr, La Montagne JR. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on tuberculosis. *Journal of infectious diseases*, 1994, 169:1189-96.
10. Tuberculosis control as an integral part of primary health care. Geneva, World Health Organization, 1988.

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Mycobacterium IgM ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgM-Antikörpern gegen Mycobacterium im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Mycobakteriosen (Tuberkulose, atypische Mycobakteriosen, Paratuberkulose und evtl. auch Morbus Crohn) gehören zu den humanen Infektionskrankheiten mit der weltweit größten Verbreitung. Aufgrund der hohen Infektiosität der pathogenen Mycobakterien ist eine frühe Diagnostik entscheidend, um die weitere Ausbreitung der Krankheit zu verhindern. Tuberkulose tritt nicht nur in Entwicklungsländern mit jährlich 8 Millionen Neuinfektionen auf, sondern man findet sie auch in hochindustrialisierten Staaten mit einigen Tausend Fällen jährlich. Ohne Behandlung führt die Krankheit in 50 % der Fälle innerhalb von weniger als zwei Jahren zum Tode. Klinische Symptome sind Erschöpfung, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, leichtes Fieber, Nachtschweiß und Stechen in der Brust. Besonders HIV-Patienten werden von der Tuberkulose wegen der Einschränkung ihres Immunsystems bedroht. Die Impfung mit lebenden abgeschwächten Bakterien ist möglich (BCG = Bacille Calmette Guérin), und zwar besonders bei Neugeborenen oder jüngeren Kindern. Bei älteren Patienten wird vor der Impfung üblicherweise der Tuberkulin-Test (Pirquet oder Mantoux) durchgeführt, wobei eine kleine Menge Tuberkulin unter die Haut injiziert wird. Im positiven Fall ist der Nachweis von Antikörpern gegen Mycobakterien gegeben, und eine Impfung ist nicht nötig. Die infektiösen Erreger der Tuberkulose sind säureresistente stäbchenförmige Bakterien der Familie Mycobacteriaceae, Genus Mycobacterium. Der Keim wurde 1882 von Robert Koch entdeckt. Bis vor kurzem gab es keine serologische Methode, um Tuberkulose-Antikörper im Serum zu erfassen. Das einzig verfügbare Verfahren bestand neben dem Tuberkulin-Test in dem direkten mikroskopischen Nachweis der angefärbten Bakterien im Sputum. Mittlerweile ist es gelungen, spezifische Antigene durch Aufreinigung von natürlichem Material oder durch rekombinante Methoden zu erzeugen. Der vorliegende ELISA Testkit zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Mycobacterium tuberculosis verwendet einen Cocktail von hochreinen Proteinen, um eine Immunreaktion gegen die Bakterien im menschlichen Serum zu erkennen.

3. TESTPRINZIP

Der Mycobacterium IgM Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Mycobacterium-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgM-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Mycobacterium-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgM-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgM-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

| Symbol | | Komponenten | Volumen / Menge |
|-------------|-----------------|---|-----------------|
| SORB | MT | Mycobacterium-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen | 12 |
| CAL | A | Kalibrator A (Negative Kontrolle) | 2 mL |
| CAL | B | Kalibrator B (Cut-Off Standard) | 2 mL |
| CAL | C | Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle) | 2 mL |
| CAL | D | Kalibrator D (Positive Kontrolle) | 2 mL |
| ENZ | CONJ | Anti-human-IgM-Enzymkonjugat | 15 mL |
| SUB | TMB | Substratlösung | 15 mL |
| STOP | SOLN | Stopp-Lösung | 15 mL |
| SAM | DIL | Probenverdünner | 60 mL |
| WASH | SOLN 10x | Waschpuffer (10x) | 60 mL |

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Mycobacterium-Antigen (rekombinante Mycobacterium tuberculosis Antigene mit 18, 36 und 40 kDa). Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Mycobacterium. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Mycobacterium. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Mycobacterium. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Mycobacterium. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgM-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgM-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser.
- Verschließbarer Plastikbeutel für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendekel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

| | Messwerte (OD) | korr. Messwerte (OD) |
|---------------------------|----------------|----------------------|
| Substrat-Leerwert | 0,014 | |
| Negativ-Kontrolle | 0,025 | 0,011 |
| Cut-Off Standard | 0,579 | 0,565 |
| schwach Positiv-Kontrolle | 1,108 | 1,094 |
| Positiv-Kontrolle | 1,851 | 1,837 |

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden. Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Mycobacterium tuberculosis Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.

Bei fraglich IgM positiven Ergebnissen bzw. zur Absicherung einer positiven Reaktion sollte eine Rheumafaktor-Absorption mit einem geeigneten Reagenz (Best.-Nr. DEMJS02, RF-Adsorbent) vorgenommen werden.

9.3. Interpretation

Auch wenn in seltenen Fällen Antikörper in gesunden Menschen nachgewiesen werden, wird hierdurch normalerweise eine Kolonisation mit Mycobacterium tuberculosis angezeigt. Positive IgM-Ergebnisse stehen mit einer Infektion im Frühstadium in Beziehung. Im Verlauf der Erkrankung findet eine Serokonversion zu IgG-Antikörpern statt. Das gleichzeitige Auftreten von IgG- und IgM-Antikörpern deutet auf eine Infektion im Frühstadium oder die Reaktivierung einer chronischen Infektion hin. Der alleinige Nachweis von IgG ist ein Zeichen für eine abgelaufene Immunantwort. IgA-Antikörper erscheinen nach der ursprünglichen Aktivierung der Immunreaktion, die durch die Gegenwart von IgM angezeigt wird und stehen in Zusammenhang mit einem hohen inflammatorischen Potential. Da die Bildung von IgA nicht wie die von IgG durch Anergieeffekte beeinflusst wird, ist IgA ein nützlicher Marker für Patienten mit einer durch eine existierende Immunsuppression reduzierten IgG-Antwort.

Die humorale Immunantwort kann wie folgt zusammengefasst werden:

- IgM (-), IgG (-), IgA (-): keine Immunantwort
- IgM (+), IgG (-), IgA (-): Infektion im Frühstadium
- IgM (-), IgG (+), IgA (+/-): abgelaufene Infektion
- IgM (+), IgG (+), IgA (+/-): Infektion im Frühstadium oder Reinfektion
- IgM (-), IgG (-), IgA (+): abgelaufene Infektion bei immunsupprimierten Patienten








10. TESTCHARAKTERISTIKA

| Mycobacterium ELISA | IgM |
|--------------------------|---|
| Intra-Assay-Präzision | 7,9 % |
| Inter-Assay-Präzision | 7,4 % |
| Inter-Lot-Präzision | 5,7 – 8,9 % |
| Analytische Sensitivität | 1,22 U/mL |
| Wiederfindung | 87 – 91 % |
| Linearität | 78 – 118 % |
| Kreuzreaktivität | Keine Kreuzreaktivität auf <i>Helicobacter pylori</i> und <i>Bordetella pertussis</i> . |
| Interferenzen | Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL. |
| Klinische Spezifität | 100 % |
| Klinische Sensitivität | 100 % |

11. LITERATUR

1. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a re-emergent killer. *Science*, 1992, 257:1055-64.
2. Kochi A. Global tuberculosis situation and the control strategy of the WHO. *Tubercle*, 1991, 72:1-6.
3. Marks LG. Genetics of tuberculosis. *Medical clinics of North America*, 1993, 77(6):1219-33.
4. Aziz A, Siddiqui SH, Ishaq M. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* from treated patients in Pakistan. *Tubercle*, 1989, 70:45-51.
5. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis Texas, California and Pennsylvania. *Morbidity and mortality weekly report*, 1990, 39:369-72.
6. TB morbidity United States, 1995. *Morbidity and mortality weekly report*, 1996, 45:365-70.
7. Barnes PF, Lee HQ, Davidson PT. Tuberculosis in patients with HIV infection. *Medical clinics of North America*, 1993, 77(6):1369-89.
8. Directorate-General for Chest Diseases. Tuberculosis control guide. Egypt, National Tuberculosis Control Programme, Ministry of Health, November 1994.
9. Snider DE Jr, La Montagne JR. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on tuberculosis. *Journal of infectious diseases*, 1994, 169:1189-96.
10. Tuberculosis control as an integral part of primary health care. Geneva, World Health Organization, 1988.
11. Toman K. Tuberculosis case-finding and chemotherapy. Questions and answers. Geneva, World Health Organization, 1979:3-74.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Français | Espanol | Italiano |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conforme aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las Instrucciones | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | Usage Diagnostic in vitro | Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Référence | Número de catálogo | No. di Cat. |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | No. de lot | Número de lote | Lotto no |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Temperature de conservation | Temperatura de conservacion | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| <i>Distributed by</i> | Distributor | Vertreiber | Distributeur | Distribuidor | Distributore |