

recomLine Aviditätsreagenz

1. Zweckbestimmung / Allgemeines

Zweckbestimmung: Testsystem zur Bestimmung der Avidität von IgG-Antikörpern.

Die klassische Infektionsserologie beruht auf der Beobachtung, dass erregerspezifische IgM-Antikörper nur vorübergehend gebildet werden, die entsprechende IgG-Antwort aber lange andauert. So ergibt sich aufgrund eines IgM-Befundes ein Hinweis auf eine akute Infektion, während ein IgG-Befund ohne paralleles IgM auf eine länger zurückliegende Infektion hindeutet. Aufgrund der Variabilität der Immunantwort und durch das Auftreten abweichender serologischer Verläufe (z.B. persistierende, reaktivierte oder fehlende IgM-Antwort) kann jedoch diese klassische Vorgehensweise in nicht wenigen Fällen zu Fehlschlüssen führen.

Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen. In der frühen Phase einer Infektion zeigen die IgG-Antikörper eine schwächere Bindung zum Antigen; stärker bindende Antikörper weisen auf eine bereits länger zurückliegende Infektion hin. Die Bestimmung der IgG-Avidität liefert als ergänzende Analyse zur klassischen Serologie Hinweise zur Datierung einer Infektion. Bei der Ausbildung der IgG-Antwort kommt es zu einer sukzessiven Zunahme der Avidität des gebildeten IgGs für das entsprechende Antigen - ein äußerst regelmäßig auftretender immunologischer Prozess. Daher liegt bei einer akuten Infektion stets ein niedrig avides IgG, bei einer abgelaufenen Infektion hoch avides IgG vor. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in den letzten Jahren ein weiterer, sehr aussagekräftiger Marker in die Diagnostik eingeführt: die Avidität des IgG.

2. Testprinzip

Für die Testdurchführung werden je zwei Teststreifen mit der verdünnten Serumprobe inkubiert. Während dieser ersten Inkubation binden Antikörper in der Probe an ihre auf dem Teststreifen fixierten spezifischen Antigene. Anschließend wird einer der beiden Teststreifen mit der Aviditätslösung gewaschen. Bei diesem Schritt diffundieren die niedrig aviden Antikörper ab, während hoch avide Antikörper an ihren spezifischen Antigenen gebunden bleiben. Nach dem Waschen werden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-human-Antikörper zugegeben. Die Sichtbarmachung der spezifischen, an ihre Antigene gebundenen Antikörper erfolgt nach erneutem Waschen durch Zugabe von einem Substrat, welches die Antigen-Antikörper-Komplexe durch das Auftreten von Banden auf den Teststreifen sichtbar macht. Die relative Position der gefärbten Banden zeigt die Spezifität der reagierenden Antikörper an. Durch den abschließenden Vergleich der beiden entsprechenden Teststreifen lässt sich eine Aussage über die Avidität der Antikörper ermitteln, die wiederum eine Interpretation der Infektionsstadiums ermöglicht.

3. Mitgelieferte Materialien

Die Reagenzien einer Packung reichen für 25 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

AVIDI	1	Aviditätsreagenz (Feststoff 25g) für 60 ml gebrauchsfertige Lösung
INSTRU	1	Gebrauchsinformation

4. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Messzylinder mit Graduierung für 50 ml, Stoppuhr

5. Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen

- Beim Umgang mit dem Reagenz (Feststoff) ist die Verwendung eines Atemschutzes und eines Augenschutzes erforderlich, die Verwendung eines Hautschutzes wird empfohlen. Die gebrauchsfertige Lösung kann ohne Atemschutz verwendet werden. Nach Kontakt mit Augen oder Haut, muss das Reagenz mit reichlich Wasser aus- bzw. abgewaschen werden.

- Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

6. Haltbarkeitsdauer und Handhabung

Das Aviditätsreagenz (Feststoff) ist im ungeöffneten Zustand gemäß den Angaben auf dem Etikett haltbar. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank (+2°C bis +8°C) oder bei Raumtemperatur. In Verbindung mit der jeweiligen recomLine Kit-Charge entspricht die Laufzeit jedoch maximal der Kit-Chargen-Laufzeit. Das Aviditätsreagenz (Feststoff) muss vor Feuchtigkeit geschützt werden.

Die gebrauchsfertige Lösung kann im Kühlschrank bei +2°C bis +8°C für 8 Wochen aufbewahrt werden. Eine Lagerung bei -20°C ist für 12 Monate möglich. Die Aviditätslösung sollte dann in warmem Wasser aufgetaut werden (Dauer ca. 45 Minuten).

7. Vorbereitung der gebrauchsfertigen Aviditätslösung

Das bereits fertig abgewogene Aviditätsreagenz wird in **40 ml** des gebrauchsfertigen Wasch- und Verdünnungspuffers gelöst. Dieser Lösungsprozess nimmt einige Zeit in Anspruch und kann bei Bedarf durch leichtes Erwärmen beschleunigt werden. Die fertige Lösung hat ein Endvolumen von etwa 60 ml.

8. Testverfahren

8.1 Allgemeines

Es müssen von jeder Probe immer zwei Streifen parallel angesetzt werden. Um eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen, wird von den beiden Streifen nur jeweils einer mit dem Aviditätsreagenz behandelt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

Es gelten zusätzlich die Angaben in den Gebrauchsinformationen der jeweiligen Testkits.

8.2 Erste Inkubation

1. Vor Gebrauch sollten alle Reagenzien etwa 30 min auf Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) gebracht werden. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.
2. Für jeden Test wird eine Inkubationswanne (Vertiefung) einer Inkubationsschale benötigt. In eine Inkubationswanne werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Wasch/Verdünnungspuffers pipettiert. In die mit Waschpuffer gefüllten Wannen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

Achtung!

Hierbei ist unbedingt darauf zu achten, dass die Streifen vollkommen mit Flüssigkeit benetzt und untergetaucht sind.

3. In je zwei Inkubationswannen werden je Inkubationsansatz **20 µl** einer unverdünnten Probe (Humanserum/Plasma) pipettiert.

Der entsprechende zweite Ansatz, der nicht mit dem Aviditätsreagenz behandelt werden soll, muss bei jeder Probe mitgeführt werden.

4. Das Inkubationsgefäß wird abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationstemperatur sollte zwischen +18°C und +25°C liegen.

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass es zu keiner Kontamination der Nachbarwannen und damit zu einem möglicherweise falsch-positiven Resultat kommt.

8.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsgefäßen abgenommen.

Achtung!

Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden (Gefahr der Kreuzkontamination).

- Die Reaktionslösung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen vorzugsweise mit einer Absaugvorrichtung mit Desinfektionsfalle abgesaugt.

Achtung!

Nach dem Absaugen der Lösung aus einer Inkubationswanne sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.

- In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers gegeben und 5 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wird der Waschpuffer abgesaugt.

8.4 Zweite Inkubation

Dem einen Ansatz wird Wasch- und Verdünnungspuffer und dem zweiten Ansatz werden **2 ml** der gebrauchsfertigen Aviditätslösung zugegeben und **3 Minuten** inkubiert. Bei diesem Schritt werden die niedrig-aviden Antikörper „abgewaschen“.

Achtung!

Es ist zwingend erforderlich die Zeitspanne von drei Minuten genau einzuhalten.

8.5 Waschen

Die Lösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen. Dabei wird der Schritt 3 von Abschnitt 8.3 insgesamt dreimal durchgeführt.

8.6 Dritte Inkubation

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Inkubationswanne 2 ml der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung gegeben und 45 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei sollte die Inkubationswanne abgedeckt sein.

8.7 Waschen

Die Lösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut dreimal gewaschen (vgl. Abschnitt 8.5).

8.8 Vierte Inkubation

- In jede Vertiefung werden **1,5 ml** Substratlösung gegeben und 5 - 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Absaugen des Substrats werden die Streifen dreimal mit deionisiertem Wasser abgespült.
- Die Streifen werden vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Waschbad entnommen und zum Trocknen 2 Stunden auf saugfähiges Papier gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und protokolliert werden.

9. Ergebnisse

Die Auswertung der Aviditätsstreifen muss anhand der diesbezüglichen Kriterien in den Gebrauchsinformationen der entsprechenden Parameter durchgeführt werden.

Ein Antikörper wird als niedrig avide bezeichnet, wenn die Intensität der dazugehörige Bande bei der Aviditätsbestimmung um ca. 50% abnimmt. Jedoch ist die Schlussfolgerung, dass jeder niedrig avide Antikörper auf eine frische Infektion hinweist, nicht zulässig. Evaluierungen zeigen, dass bei jedem zu untersuchenden Parameter die niedrig aviden Antikörper unterschiedlich zu werten sind. Deswegen ist es für die Interpretation der Avidität unerlässlich, die jeweilige Gebrauchsinformation des zu untersuchenden Parameters zu beachten.

Vergleichen Sie die Intensitäten der entsprechenden Banden auf den beiden Teststreifen, die mit dem gleichen Serum inkubiert wurden. Achten Sie darauf, ob sich die Intensitäten verändert haben.

Eine komplette Abnahme aller Intensitäten ist ein relativ sicherer Hinweis auf eine frische Infektion. Generell gilt, dass für die Aviditätsbeurteilung keine absoluten Regeln aufgestellt werden können. Die Interpretation der Avidität muss immer im Zusammenhang mit den gesamten Untersuchungsergebnissen erfolgen.






10. Grenzen der Methode, Einschränkungen

- Es wird darauf hingewiesen, dass Abweichungen von der vorgeschriebenen Testprozedur zu Fehlbeurteilungen führen können. Die vorgeschriebenen Inkubationszeiten sind unbedingt einzuhalten.
- Alle Testergebnisse sollten als Ergänzung zum klinischen Bild betrachtet werden. Zur Festlegung der Diagnose sind in jedem Fall auch die klinischen Befunde und die zugehörige Anamnese mit einzubeziehen.

11. Leistungsmerkmale

Ausführliche Informationen bezüglich der Leistungsmerkmale finden Sie in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen recomLine-Tests, für den das recomLine Aviditätsreagenz bestellt wurde.

12. Erläuterungen der Symbole

	Inhalt ist ausreichend für <n> Ansätze Anzahl der Ansätze
AVIDI	Aviditätsreagenz
INSTRU	Gebrauchsanweisung
	Gebrauchsanweisung beachten
IVD	In-vitro-Diagnostikum
CONT	Inhalt, enthält
LOT	Chargen-/Versionsnummer
REF	Bestell-Nummer
	Verwendbar bis Verfallsdatum
	Lagerung bei x°C bis y°C
	Hersteller

recomLine Avidity reagent

1. Intended purpose / General aspects

Intended purpose: Test system for determination of the avidity of IgG antibodies.

The classical serology of infectious diseases is based on the observation that IgM-antibodies specific to a certain type of pathogen are formed only temporarily, whereas the respective IgG response continues for a long time. For this reason, IgM diagnosis indicates acute infection, but IgG diagnosis without parallel IgM is a sign of past infection. Due to the variability of immune response and to the occurrence of aberrant serological processes (e.g. persistent, reactivated or absent IgM response) this classical approach may lead to false conclusions in many cases.

Avidity describes the binding strength of specific antibody to antigen. It was found to be low in the first phase after primary infection but then to increase over time. In addition to classic serodiagnosis, measurement of avidity provides information making it possible to distinguish between acute and past infection. During IgG response there is a continuous increase in the avidity of IgG for the respective antigen. This occurs as an immunological principle. For this reason, IgG with a low avidity is usually present in acute infection and IgG with high avidity is present after infection has ended. As a result of this observation, another very significant marker has been introduced into diagnosis in the last few years: the avidity of IgG.

2. Test principle

Two test strips are incubated with the diluted serum sample for each test run. During this initial incubation, antibodies in the sample bind to their specific antigens, which are fixed on the test strips. Then one of the two test strips is washed with avidity solution. During this step, the low avid antibodies are removed by diffusion while the high avid antibodies remain bound to their specific antigens. Following the washing step, anti-human antibodies conjugated with horse radish peroxidase are added. The specific antibodies bound to their antigens is made visible by adding a substrate that forms bands on the test strips. The relative position of the coloured bands indicates the specificity of the reacting antibodies. Subsequent comparison of the two test strips then provides a basis for measuring the avidity of the antibodies and for establishing the stage of infection.

3. Materials supplied

The reagents in a pack are sufficient for 25 determinations.

Each reagent set contains:

AVIDI	1	Avidity reagent (solid 25g) for 60 ml ready-to-use solution
INSTRU	1	Instructions for use

4. Materials required but not supplied

Metric cylinder with graduations for 50 ml ,stop watch

5. Warnings and safety precautions

- When handling the reagent (solid), equipment designed to protect the respiratory system and eyes must be used and use of clothing designed to protect the skin is also recommended. The ready-to-use solution can be used without respiratory protection. If the reagent comes into contact with eyes or skin it must be rinsed off/out with plenty of water.
- Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

6. Shelf life and handling

The stability period of the unopened avidity reagent product (solid) is as indicated on the label. The reagent is stored in the refrigerator (at +2°C to +8°C) or at room temperature. In connection with the particular recomLine kit lot the maximum stability period cannot, however, exceed the kit lot stability period. The avidity reagent (solid) must be protected from moisture.

The ready-to-use solution can be stored in the refrigerator at +2°C to +8°C for 8 weeks. It can be stored at -20°C over a period of 12 months. In this case, the avidity solution should be thawed in warm water (for about 45 minutes).

7. Preparation of ready-to-use avidity solution

The weighed-out avidity reagent is dissolved in **40 ml** of the ready-to-use wash and dilution buffer. This dissolving process takes some time and can be accelerated by mild warming. The solution has now a final volume of about 60 ml.

8. Test procedure

8.1 General

Two parallel strips must always be charged with each sample. To make a comparative evaluation possible, only one of the two strips is then treated with the avidity solution. The reproducibility of the results depends mainly on constant washing of the strips. The washing frequencies as mentioned above should therefore always be complied with.

The instructions for use of the respective test kit have to be applied also.

8.2 Initial Inkubation

1. Before use, all reagents should be tempered to room temperature for about 30 minutes (+18°C to +25°C). The test procedure is also carried out at room temperature.
2. One well in the incubation tray is required per test charge. **2 ml** of the ready-to-use wash and dilution buffer are pipetted into each incubation well. A test strip is then carefully placed in each of the wells filled with wash buffer using a forceps. The strip number must face upwards.

Important!

Make sure the strips are completely wet and immersed in the liquid.

3. **20 µl** of an undiluted sample (human serum / plasma) are pipetted into each of two incubation wells for each incubation charge.

The corresponding second charge, which is not to be treated with the avidity solution, must be tested parallel to each sample.

4. The incubation tray is covered with the plastic lid and incubated at room temperature for **1 hour** while shaking gently. The incubation temperature should be between +18°C and +25°C.

Make absolutely sure there is no contamination of adjacent wells, which could lead to false-positive results.

8.3 Washing

1. Following incubation the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.

Important!

Make sure the incubation solutions are not entrained into other wells; avoid splashing, especially when opening or closing the lid (danger of cross-contamination).

2. The reaction solution is carefully aspirated from the individual wells, preferably with a vacuum extraction pipette fitted with a disinfection trap.

Important!

After aspirating the solution from an incubation well, the pipette tips must be changed or rinsed thoroughly with deionised water after each aspiration procedure due to the risk of cross-contamination.

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer into each well and incubate for 5 minutes while shaking gently. The wash buffer is aspirated after the washing procedure.

8.4 Second Inkubation

2 ml of the ready-to-use avidity solution are added to the first charge and wash buffer are added to the second charge, followed by an incubation for **3 minutes**. In this step, the low-avidity antibodies are "washed off."

Important!

It is very important to incubate for exactly three minutes.

8.5 Washing

The solutions are aspirated from the incubation wells and the strips are washed again, whereby step 3 of section 8.3 is carried out a total of three times.

8.6 Third Inkubation

After the strips are washed, 2 ml of the appropriately prepared conjugate solution are added to each incubation well and incubated while shaking gently for 45 minutes, whereby the incubation tray is covered by the plastic lid.

8.7 Washing

The solutions are aspirated from the incubation wells and the strips are washed again three times (see 8.5).

8.8 Fourth Inkubation

1. **1.5 ml** of substrate solution are placed in each well, then incubated for 5 - 15 minutes at room temperature while shaking gently.
2. After the substrate has been aspirated, the strips are rinsed three times with deionised water.
3. The strips are carefully removed from the water using a forceps and placed on absorbent paper to dry for 2 hours. Then the strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be entered in the protocol.

9. Results

The evaluation of the avidity strips has to be based on the relevant criteria in the instructions for use for the corresponding parameters.

An antibody is considered to have low avidity if the intensity of the corresponding bands is reduced by approx. 50% in the avidity test. However, the conclusion that any low-avidity antibodies indicate a fresh infection is incorrect. It has been shown that the low-avidity antibodies require different evaluations for each parameter tested. It is therefore absolutely necessary to comply with the instructions for use of each parameter tested for avidity.

Compare the intensities of the corresponding bands on the two test strips incubated with the same serum. Verify that the intensities have changed.

A complete reduction of all intensities is a relatively reliable sign of a fresh infection. Generally, no absolute rules can be set up for avidity evaluation. The interpretation of avidity has to be done always within the context of the overall test results.

10. Limits of the method, restrictions

- Deviations from the test procedure as described may falsify the interpretation of the results. It is absolutely necessary to keep incubation times as indicated.
- All test results should be considered as supplements to the overall clinical picture. To confirm the diagnosis, the clinical findings and relevant medical history have to be considered as well.

11. Performance characteristics

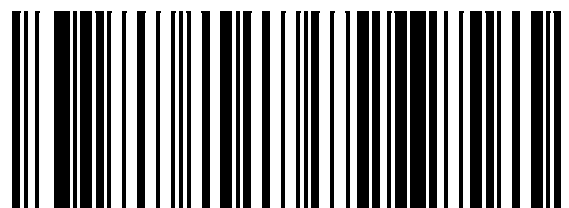
Detailed information regarding the performance characteristics can be found in the instructions for use of the respective *recomLine* test for which the *recomLine* Avidity reagent was ordered.

12. Explanation of symbols

	Content is sufficient for <n> formulations Number of formulations
AVIDI	Avidity reagent
INSTRU	Instructions for use
	Follow the instructions for use
IVD	<i>In-vitro</i> diagnostic medical device
CONT	Contents, contains
LOT	Batch/version number
REF	Order number
	Use by Expiry date
	Store between x°C and y°C
	Manufacturer

Ergänzungen, Berichtigungen oder Änderungen gegenüber der vorherigen Fassung sind durch Markierungen am Rand gekennzeichnet. / Additions, corrections or changes to the previous version are indicated by markings in the margin.

recomLine Aviditätsreagenz / recomLine Avidity reagent		Artikel-Nr./ Article No.:	11060
		Gebrauchsanweisung/ Instructions for use:	GIAVID010DE
		gültig ab/ valid from:	2023-05
MIKROGEN GmbH	Tel:	+49 (0)89 54 80 1-0	
Anna-Sigmund-Str. 10	Fax:	+49 (0)89 54 80 1-100	
82061 Neuried			
Germany			
www.mikrogen.de	mikrogen@mikrogen.de		



GIAVID010