



VIR-ELISA ANTI - RUBELLA- IgM (Immunocapture assay)



1. INTENDED USE

Immunocapture assay for qualitative determination of IgM specific antibodies to Rubella virus in human serum and plasma.

IgM REF EM 126 ▽ 96 IVD

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The ELISA test ANTI - RUBELLA - IgM is based on the anti- μ -capture principle. Anti-human IgM antibodies are fixed to each well of the microtiterstrips. All the IgM class antibodies present in the patient's sample are bound during the first incubation to the solid-phase antibody. After removing unbound material by washing rubella antigen/POD conjugate is added. During the second incubation the conjugate will bind to the Rubella specific IgM antibodies, which have been captured by the anti-human IgM antibodies during the first incubation. Excess conjugate is then removed by washing and TMB substrate is added, resulting in the development of a blue colour. The enzyme reaction is terminated by the addition of a stop solution. The intensity of the yellow colour thus developed is proportional to the concentration of antibodies in the sample.

3. DIAGNOSTIC RELEVANCE AND INTERPRETATION OF RESULTS

Shortly after the viraemic phase (which lasts approx. 5-6 days) antibodies are generated. Acute infection results in high IgG as well as IgM antibodies. The detection of both antibodies in high concentration is possible for up to 8 weeks, then the level of antibodies falls. While IgM antibodies disappear generally, IgG antibodies persist life-long.

Following a Rubella immunisation the increase in antibody is significant, although the concentration of antibodies is generally lower than for an infection. Specific IgG antibodies can be detected for up to 15 years, IgM on average 8-12 weeks. In special cases, persisting IgM antibodies were found over several months.

Serological findings in a Rubella virus infection are strongly dependent on the stage and duration of the clinical symptoms. A single antibody activity, even a high level activity, does not provide proof of a recent infection and cannot necessarily be equated with adequate immune protection. To obtain a final diagnosis the patient history and clinical symptoms should be taken into consideration.

Note!

In case of a positive IgM antibody detection it is essential to confirm this result with at least two other different tests !

IgG	IgM	Interpretation	Recommendation
-	-	no specific antibodies (Ab) detectable, however infection possible	By suspect of acute infection – control tests are recommendable (after 7 days at the latest)
+	-	probable previous infection or vaccination, reinfection possible	Monitoring of IgG antibodies (Sample collection within 10-14 days), a significant increase of IgG Ab concentration in the absence of IgM Ab indicates a reinfection
-	+	primary infection probable	Monitoring of IgG and IgM Ab to determine seroconversion; supplementary tests e.g. IFA,CF,HAH and determination of the avidity of the IgG Ab.
+	+	acute infection probable, vaccination possible	Monitoring of IgG and IgM antibodies; supplementary tests e.g. IFA,CF,HAH and determination of the avidity of the IgG Ab

- negative, + positive

4. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity / Sensitivity

292 samples were tested in parallel in VIR-ELISA ANTI-RUBELLA-IgM (Immunocapture assay) and comparison methods (ELISA). The specificity and sensitivity are based on the results found.

Specificity: IgM 99,2% **Sensitivity:** IgM 100%

For the calculation of the **specificity and sensitivity** of the ELISA test, equivocal results were defined as positive. The results refer to the groups of samples investigated.

Precision and reproducibility

Intra-assay reproducibility was determined by testing samples of different levels of antibody reactivity for at least 22 times in one test run. The coefficient of variation (CV) of the reactive IgM samples was < 10%.

Inter-assay reproducibility was determined by testing samples of different levels of antibody reactivity in 10 different test runs. The CV of the reactive IgM samples was < 10%.

Cross reactivity

A patient may have developed specific rubella IgM antibodies as a result of a polyclonal response to a primary infection such as with Epstein-Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Hepatitis A or even Gram-negative bacteria.

5. Bib

- Pustowitz, B. in T. Porstmann, Diagnostische Bibliothek, Vol.26 (1994) Blackwell Wissenschaftsverlag
- Selb, B.: Medizinische Virusdiagnostik (1992), Umschau Verlag, Frankfurt

6. KIT COMPONENTS

- MICROTITERSTRIPS** MTS
One microtiterplate is supplied, which contains 12 microtiterstrips of 8 breakapart wells. Each well is coated with mouse antibodies to human IgM.
- SAMPLE DILUENT** SPE|DIL|RUBELLA|IgM
One bottle containing 100 ml (or 2x50 ml) of ready-to-use sample diluent buffer Rubella IgM. The buffer includes 0.05% microbial preservative.
- PEROXIDASE CONJUGATE** CONJ|POD
One vial containing 12 ml of ready-to-use rubella antigen/POD conjugate with 0.049% Thimerosal as preservative.
- NEGATIVE CONTROL** CONTROL|-
One vial of 1.2 ml containing human serum with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use.
- CUT OFF CONTROL** CUTOFF
One vial of 1.2 ml containing human serum with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use.
- POSITIVE CONTROL** CONTROL|+
One vial of 1.2 ml containing human serum with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use.
- TMB SUBSTRATE** SUBS|TMB
One vial containing 13 ml of ready-to-use tetra-methylbenzidine (TMB) substrate.
- WASH SOLUTION 25X** WASH|BUF|25x
One bottle containing 80 ml (or 2x40 ml) of wash solution concentrate.
- STOP SOLUTION** SOLN|STOP
One bottle containing 15 ml of 0.95N H₂SO₄ stop solution. Ready to use.
- ADHESIVE SEALS**

The safety data sheet (MSDS) is available upon request.

7. STORAGE AND STABILITY

Store all reagents at 2-8°C. Protect them from intense light and do not freeze. The expiration date of each component is indicated on the respective vial label. Do not use reagents beyond the expiration date.

After opening, MTS must be stored at 2-8°C in the plastic bag with desiccant and are stable up to 4 weeks.

The diluted WASHBUF is stable up to 4 weeks if stored at 2-8°C.

Use only MTS with an intact vacuum packaging.

8.

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Test tubes for sample dilution
- Timer
- Micropipettes, multipipettes 10-1000 μ l
- One-litre graduated cylinder, distilled water
- ELISA washer or multichannel pipette
- Spectrophotometer for micro-plates (450-nm/ reference wavelength 630/620 nm)
- Paper towels, pipette tips
- Incubator for \bar{x} 37°C with high relative humidity

9. WARNINGS OR PRECAUTIONS SAFETY PRECAUTIONS

The ELISA test is for **IVD** use only.

- Do not mix lot specific reagents, such as **MTS**, controls and **CONJ|POD** from different kit lots. **SUBS|TMB** and **SPE|DIL|RUBELLA|IgM** don't have to be from the original test kit. But the lot of these reagents should be the same as indicated on the kit label. **WASHBUF|25x** and **SOLN|STOP** can be used for all ELISA tests.
- Seal all bottles properly after use in order to avoid bacterial contamination. All samples and kit components should be considered potentially infectious. All controls have been tested for Hepatitis Bs antigen, anti-HIV I, anti-HIV II, anti-HCV (CE/FDA), and found to be negative.
- Do not pipette by mouth.
- Avoid contact with skin and mucous membranes when handling reagents, which contain preservatives (see kit contents). Wash thoroughly with water in case of contact and possibly look up a doctor.
- Controls containing sodium azide may react with lead and copper plumbing, building up explosive metal acids. Flush with sufficient water when disposing of reagents.
- The **SOLN|STOP** (0,95 N H₂SO₄) contains sodium hydroxide which may irritate skin and mucous membranes. Wash thoroughly with water in case of contact.
- For disposal the legal regulations have to be followed.

10. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Only qualified and well-trained employees should carry out the assay procedure.
- The instruction for use describes the applicable test method. In case of modification or applications others than the intended use, or the use of automatic processors, the user has to validate the procedure and take the responsibility for it.
- Microbial contaminated specimen may cause interferences.
- Lipaemic, hemolytic or icteric samples should only be tested with reservations although in our testing no negative influence has been found.
- Suitable specimens are serum or plasma (heparinized citrated, EDTA) samples obtained by standard laboratory techniques.
- The samples should not be heat-inactivated since non-specific results may occur.
- Results on tests using CSF are not available.
- Patient samples should be stored at \pm 2-8°C. For long-term storage \pm -20°C or lower is recommended. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- Note:** Diluted patient samples must be used on the same day.

11. ASSAY PROCEDURE REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature prior to use!

WASHBUF: Dilute the **WASHBUF|25x** 1:25 with distilled water e.g. add 40ml of **WASHBUF|25x** to 960 ml distilled water and mix well.

Dilution of samples: Dilute patient samples **1:101** with **SPE|DIL|RUBELLA|IgM** e.g. 10µl sample + 1ml **SPE|DIL|RUBELLA|IgM**, mix thoroughly.

Controls are ready to use !

Note: To take into consideration pipetting time, it is recommended to repeat the **CUTOFF** after every 6 **MTS** (resp. after a pipetting time of \geq 7 min.) to evaluate the following patient's tests with the new calculated cut-off value.

Take the required **MTS** out of the foil packets and place them in the holder. Possibly remaining wells of a **MTS** have to be stored at 2-8°C tightly sealed in the plastic bag provided, with the desiccant inside.

12. PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- Pipette 100µl of each control and each diluted patient sample into the wells. **Leave a well (A1) empty for the blank** (100µl **SUBS|TMB**).
- Cover the **MTS** with an adhesive seal and incubate the wells for 60 minutes at 37°C (\pm 1°C) in an incubator with relative high humidity or in a humid chamber.
- Wash the wells four times as described in section k. **WASHING PROCEDURE**
- Add 100µl of ready-to-use peroxidase conjugate to each well **except of the blank** (A1).
- Cover the **MTS** with an adhesive seal and incubate the wells for 30 minutes at 37°C (\pm 1°C) in an incubator with relative high humidity or in a humid chamber.
- Repeat washing as in section C above.
- Add 100µl of ready-to-use TMB substrate to each well.
- Incubate the wells at room temperature (18...25°C), in the dark for 30 minutes
- Add 100µl of stop solution to each well. Tap gently to ensure homogenous colour distribution and read within 10 minutes.
- To read the plate, make sure that the bottom is free from moisture and that no air bubbles are in the wells. Read the absorbance of the well contents at 450nm on a suitable plate reader. On readers equipped with a dual wavelength facility set the reference filter to 620/630 nm.

Attention: The absorbance (OD) of the Blank must always subtracted from the OD values of the controls and samples.

PROCEDURAL NOTES

Do not allow the wells to dry out between incubations.

Comply with the given incubation temperatures and times.

k. **WASHING PROCEDURE**

The washing procedure can be done manually with a multichannel pipette or on an automatic plate washer. Empty the wells, invert and tap dry on paper towel. Wash four times with a soaking time of approx. 30 seconds (300 µl).

13. SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

In case that the ELISA instructions are followed strictly, the reagents are handled with care and the samples and reagents are pipetted carefully, the following kinds of errors can be avoided to a large extend.

ERROR	POSSIBLE CAUSES
No colorimetric reaction after addition of Peroxidase conjugate and TMB substrate	No Peroxidase conjugate dispensed, contamination of Peroxidase conjugate (possibly with control sera during pipetting) may cause an inactivation.
Generally too high reaction	Incorrect Peroxidase conjugate (i.e. not from original test kit), incubation time too long or incubation temperature too high, water quality for Washing Solution insufficient (low grade of deionisation).
Generally too weak reaction	Incorrect Peroxidase conjugate (i.e. not from original test kit), incubation time too short, incubation temperature too low.
Reagent blank too high	Incorrect pipetting of sample diluent, contaminated reagents, reagents expired, exceeding of incubation time and temperature, external contamination of the bottom of microtiterstrips, (clean carefully!).
False positive / negative samples	Incorrect dilution of samples, microbial contaminated specimen
Unexplainable outliers	Contamination of pipettes, tips or containers or with metals (iron, copper etc.), insufficient washing.
High variation (within a series)	Reagents (including microtiterstrips) not pre-warmed to room temperature prior to use. Washer is not washing correctly!
High variation (from series to series)	Incubation conditions not constant (time, temperature) high variation of incubation temperature, controls and samples are not carried out at same time (same intervals) check pipetting order, person related variation, strips dried out after washing (results are not reproducible).

14. VALIDITY OF THE ASSAY

All controls should be carried out with every test run.

The test must comply with the following validation criteria:

- OD-value of the Negative Control should be < 0.150 ,
- OD-value of the Cut-off Control should be > 0.200 ,
- Ratio of the Positive Control/ Cut-off value should be ≥ 2.0 ,
- OD-value of the Blank should not be higher than 0.100 .

If controls give invalid levels then results from the test samples are invalid too and retesting is required.

15. CALCULATION OF RESULTS

A QUALITATIVE CALCULATION

Calculation of "Cut-off Value"

CUT-OFF VALUE = OD VALUE OF THE **CUTOFF**

CUT-OFF RANGE = CUT-OFF VALUE $\pm 10\%$

Interpretation of sample results:

RESULT	DEFINITION
negative -	OD value sample $<$ Cut-off value -10%
equivocal	OD value sample \geq Cut-off value -10% OD value sample \leq Cut-off value +10%
positive +	OD value sample $>$ Cut-off value +10%

Equivocal results should be retested. Following the confirmation of the equivocal result the monitoring of the patient's antibodies is recommended in order to exclude unspecific reactions, which may also cause equivocal results.

B CALCULATION OF RATIO (CUTOFF INDEX, COI):

Patient samples may also be quantified and interpreted by means of the calculation of the ratio (Cutoff Index, COI):

COI = OD value of sample/ Cut-off value,

whereby a ratio of 1.000 is equivalent to the Cut-off value.

Interpretation of sample results:

Ratio $> 1,1$ positive result
Ratio $< 0,9$ negative result
Ratio $0,9-1,1$ equivocal result

Regarding diagnostic relevance and interpretation of results see **page 1**.

For further information please visit our website:

<http://www.viro-immun.de/>

Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole / Símbolos/ Simboli/ Simbolos/ Symboly/ Címkékén/ Συμβολα IVD

MTS

Mikrotiterstreifen/ microtiterstrips/ Microplaques sensibilisées/ placa de microtítulo/ piasta microtítulo/ placa do microtitre/ Mikrotitračni Stripy/ Mikrotiterscíkók/ Ταινίες μικροπιλοποίησης

SPE|DIL|RUBELLA|IgM

Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Redidlo na Vzorek/ Mintahígító/ Αραιωτικό Δείγματος

WASHBUF|25x

Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promývaci Roztok 25x/ Mosópuferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x

CONJ|POD

Peroxidase-Konjugat / Peroxidase conjugate / Conjugue Peroxidase/Conjugado Peroxidasa / coniugato con perossidasi/ conjugado Peroxidase/ Konjugát Peroxidáza/ Peroxidáz Konjugátum/ Συζευγμένη υπεροξειδάση

CONTROL-

Negative Kontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ control negativo/ controllo negativo/ controle negativo / Negativní Kontrola/ Negativ Kontroll/ αρνητικός Μάρτυρας

CUTOFF

Cut-off Kontrolle/ cut-off control/ Contrôle cut-off/ control valor límite/ controllo limitante/ controle interrupção/ cut off kontrola/ cut off kontroll/ μάρτυρας αποκοπής

CONTROL+

Positive Kontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ control positivo/ controllo positivo/ controle positivo/ pozitivní kontrola/ pozitív kontroll/ θετικός μάρτυρας

SUBS|TMB

TMB-Substrat/ TMB substrate/ substrat TMB/ substrato TMB / Substrát TMB/ TMB Szubsztrát/ Υπόστρωμα TMB

SOLN|STOP

Stopplösung/ stop solution/ Solution d'arrêt/ solución de parada/ soluzione d'arresto/ solução de parada/ Stop Činidlo/ Stop Oldat/ Διάλυμα Τερματισμού

Bib

Literatur/ Literature/ Littérature/ Bibliografia/ Bibliografia/ Literatura/ Irodalom/ Βιβλιογραφία

LOT

Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote/ Číslo Šarže/ Lot Szám/ Αριθμός παρτίδας

IVD

In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro Diagnostický Zdravotnický Prostředek/ In Vitro Diagnostikum/ Διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro

REF

Artikel Nr./ reference or order number/ Référence ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commissione/ referência ou número de encomenda/ Katalogové Číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Κωδικός Καταλόγου

96

96 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes / Počet Testů/ Vizsgálatok Száma/ Αριθμός εξετάσεων

i

Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruções de uso/ Přečtěte si Návod k Použití/ Olvassa el a Használati Utasítást/ Δείτε Οδηγίες Χρήσεως

T

Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/ Teplotní Omezení/ Hőmérsékleti Korlátozások/ Θερμοκρασιακά όρια

h

Verfallsdatum:/ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di decadenza/ Limite de validade/ Datum Expirace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)

factory

Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ Vgyőrcse/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...

CE

Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12 email: info@viro-immun.de

CE 0123



VIR-ELISA ANTI - RUBELLA - IgM (Immunocaptureassay)



1. VERWENDUNGSZWECK

Immunocaptureassay zur qualitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Rubella-Virus in humanem Serum und Plasma.

IgM REF EM 126 ▽ 96 IVD

2. TESTPRINZIP

Der ANTI-RUBELLA-IgM ELISA arbeitet nach dem Anti- μ -capture-Prinzip. Die Mikrotiterstreifen sind mit Antihuman-IgM-Antikörper beschichtet. Die in der Untersuchungsprobe vorhandenen IgM-spezifischen Antikörper werden an das Antihuman-IgM der Platte gebunden. Nach sorgfältigem Waschvorgang, bei dem alle nicht gebundenen Probenbestandteile entfernt werden, wird Peroxidase-Konjugat (rubella antigen/POD conjugate) pipettiert, welches sich spezifisch an die bereits gebundenen Rubella-IgM-Antikörper anlagert. Im anschließenden Waschprozess wird überschüssiges Konjugat (rubella antigen/POD conjugate) entfernt. Nach Inkubation mit TMB-Substrat entsteht eine photometrisch messbare Enzym/Substratreaktion (blaue Färbung), die durch Zugabe von Stopplösung (Farbumschlag zu gelber Färbung) gestoppt wird. Der gemessene Extinktionswert (OD) ist proportional der spezifischen Antikörperkonzentration in der Probe.

3. DIAGNOSTISCHE RELEVANZ UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Kurz nach der virämischen Phase (Dauer ca. 5-6 Tage) kommt es zur humoralen Antikörperantwort. Hohe **IgG- sowie IgM-Antikörperkonzentrationen** sind die Folge einer frischen Infektion. Der Nachweis von beiden Antikörpern in erhöhten Konzentrationen ist bis zu 8 Wochen möglich, dann sinkt der Antikörperspiegel allmählich ab. **IgM-Antikörper** verschwinden in der Regel, **IgG-Antikörper** persistieren lebenslang.

Bei einer Rötelnlebensimpfung kommt es zu signifikanten Konzentrationsanstiegen, sie sind jedoch prinzipiell niedriger als bei einer Infektion. Spezifische IgG-Antikörper bleiben bis zu 15 Jahren nachweisbar, IgM-Antikörper im Durchschnitt 8-12 Wochen. In Ausnahmefällen ist lang-persistierendes IgM über mehrere Monate gefunden worden.

Serologische Befunde bei einer Rubellavirus-Infektion sind vom Stadium der Erkrankung und der Dauer der klinischen Symptome stark abhängig. Eine bestimmte Antikörperkonzentration, gleich welcher Höhe, beweist keine frische Infektion und ist nicht unbedingt mit einem ausreichenden Infektionsschutz gleichzusetzen. Für eine endgültige Diagnose sollten neben der Serologie die Anamnese sowie das klinische Bild unbedingt hinzugezogen werden.

Achtung! Im Falle eines positiven IgM-Antikörper-Befundes ist es erforderlich das Ergebnis zusätzlich mit mindestens zwei unterschiedlichen Testen zu bestätigen.

IgG	IgM	Interpretation	Empfehlung
-	-	keine Antikörper (Ak) nachweisbar	Bei Verdacht auf eine akute Infektion sollten weitere Untersuchungen folgen (spätestens nach 7 Tagen).
+	-	wahrscheinlich zurückliegende Infektion bzw. Impfung; Reinfektion möglich	Verlaufskontrolle der IgG-AK (Proben im Abstand von 10-14 Tagen gewonnen), ein signifikanter Konzentrationsanstieg bei fehlenden IgM-AK lässt auf eine Reinfektion oder eine Impfung schließen.
-	+	Erstinfektion wahrscheinlich	Verlaufskontrolle der IgG- und IgM-AK; Serokonversion der IgG-AK aufzeigen; Zusatzteste z.B. IFT, HAH-Antikörpernachweis, und Bestimmung der Avidität der IgG-AK.
+	+	akute Infektion wahrscheinlich, Impfung möglich	Verlaufskontrolle: signifikanter Konzentrationsanstieg von IgG-AK aufzeigen; Zusatzteste z.B. IFT, HAH-Antikörpernachweis, und Bestimmung der Avidität der IgG-AK

- negativ, + positiv

4. TESTCHARACTERISTIKA

Spezifität / Sensitivität

Es wurden 292 Proben parallel im VIR-ELISA ANTI-RUBELLA-IgM (Immunocaptureassay) und in Vergleichsmethoden (ELISA) getestet. Die Angaben zur Spezifität und Sensitivität des VIR-ELISA beziehen sich auf die gefundenen Testergebnisse.

Spezifität: IgM 99,2% **Sensitivität:** IgM 100%

Grenzwertige Proben wurden bei der Berechnung grundsätzlich als positiv bewertet. Die Berechnungen zur Bestimmung der **Spezifität und Sensitivität** beziehen sich nur auf die untersuchten Probenkollektive.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die intraserielle Präzision (Intraassay) wurde mittels unterschiedlich reaktiver Proben im Mehrfachansatz (n=22) innerhalb einer mit Antihuman-IgM-Antikörper beschichteten Platte berechnet. Die ermittelten Variations-Koeffizienten (VK) der reaktiven Proben im IgM Test betragen < 10 %.

Für die Bestimmung der interseriellen Reproduzierbarkeit (Interassay) wurden unterschiedlich reaktive Proben in 10 unabhängig voneinander durchgeführten Testläufen angesetzt. Die ermittelten Variations-Koeffizienten (VK) der reaktiven Proben im IgM Test betragen < 10 %.

Kreuzreaktionen

Spezifische Rubella-IgM-Antikörper können vorliegen, die durch polyklonale Stimulierung bei primären Infektionen z.B.: bei Epstein-Barr- (EBV), Cytomegalie- (CMV), Hepatitis A-Viren und auch gramnegativen Bakterien gebildet werden.

5. Bib

- Pustowitz, B. in T. Porstmann, Diagnostische Bibliothek, Vol.26 (1994) Blackwell Wissenschaftsverlag
- Selb, B.: Medizinische Virusdiagnostik (1992), Umschau Verlag, Frankfurt

6. KITKOMPONENTEN

1. MIKROTITERSTREIFEN MTS

Eine Mikrotiterplatte mit 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 einzeln brechbaren Wells. Die Wells sind mit Antihuman-IgM (von der Maus) beschichtet.

2. PROBENVERDÜNNUNGSPUFFER SPE|DIL|RUBELLA|IgM

Ein Fläschchen (100 ml) oder (2x50 ml) Probenverdünnungspuffer Rubella IgM mit 0,05 % antimikrobiellem Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

3. PEROXIDASE KONJUGAT CONJ|POD

Ein Fläschchen (12 ml) rubella antigen/POD conjugate mit 0,049% Thimerosal als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

4. NEGATIVE KONTROLLE CONTROL-

Ein Fläschchen (1,2 ml), Humanserum, mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

5. CUT-OFF-KONTROLLE CUTOFF

Ein Fläschchen (12 ml) rubella antigen/POD conjugate mit 0,049% Thimerosal als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

6. POSITIVE KONTROLLE CONTROL+

Ein Fläschchen (12 ml) rubella antigen/POD conjugate mit 0,049% Thimerosal als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

7. WASCHLÖSUNG 25X WASHBUF|25x

Ein Fläschchen (80 ml) oder (2x40 ml) Waschlösungskonzentrat.

8. TMB SUBSTRATLÖSUNG SUBS|TMB

Ein Fläschchen (13 ml) Tetra-Methylbenzidin-Substrat (TMB). Gebrauchsfertig.

9. STOPPLÖSUNG SOLN|STOP

Ein Fläschchen (15 ml) mit 0,95 N H₂SO₄ Stopplösung. Gebrauchsfertig.

10. ABDECKFOLIEN

Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

7. LAGERUNG UND STABILITÄT

Alle Reagenzien sind bei \pm 2-8°C zu lagern. Reagenzien nicht einfrieren sowie vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Die Haltbarkeit der Reagenzien ist auf den Etiketten angegeben, nach Verfallsdatum sind diese nicht mehr zu verwenden. Nach Öffnung sind die MTS bei \pm 2-8°C in Gegenwart von Trockenmittel zu lagern und bis zu 4 Wochen haltbar. Die Gebrauchsverdünnung des WASHBUF ist bis zu 4 Wochen bei \pm 2-8°C haltbar.

Nur MTS mit intakter Vakuumverpackung verwenden.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Röhrchen für die Probenverdünnung
- Stoppuhr
- Mikropipetten, Multipipette 10-1000 μ l
- Messzylinder für 1 L,
- Aqua dest.
- ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten:
Wellenlänge 450 nm/Referenzwellenlänge 630/620nm
- Saugfähiges Papier, Einwegspitzen
- Brutschrank \pm 37°C (mit hoher, relativer Luftfeuchtigkeit)

9. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN SICHERHEITSHINWEISE

Der Test ist ausschließlich für **[IVD]** hergestellt.

1. Chargenspezifische Reagenzien wie **[MTS]**, Kontrollen und **[CONJ|POD]** aus Kits unterschiedlicher Chargen nicht austauschen. **[SUBS|TMB]** und **[SPE|DIL|RUBELLA|IgM]** müssen chargenspezifisch, nicht aber kitspezifisch verwendet werden. **[WASH|BUF|25x]** und **[SOLN|STOP]** können bei allen ELISA Testen chargen- und kitunabhängig verwendet werden.
2. Alle Fläschchen nach Gebrauch gut verschließen, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden. Alle Patientenproben und Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Kontrollen wurden auf HBs-Ag, HCV- und HIV I und II -Ak getestet und für negativ befunden.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren
4. Einige Reagenzien (siehe Kithalt) enthalten Konservierungsmittel. Der Kontakt mit Haut und Schleimhaut ist zu vermeiden. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
5. Das in den Kontrollen enthaltene Natriumazid bildet bei Kontakt mit Blei- und/oder Kupferrohren explosive Metallazide, deshalb sollte bei deren Beseitigung mit reichlich Wasser nachgespült werden. S-Sätze: 26.1, 28.1 und S-46. Gefahrenhinweis: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Arzt aufsuchen.
6. Die **[SOLN|STOP]** (0,95 N H₂SO₄) ist eine ätzende Flüssigkeit. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser und Seife abwaschen.
7. Zur Entsorgung sind die gesetzlichen Regelungen zu beachten.

10. PROBENGEWINNUNG- UND LAGERUNG

1. Die Testdurchführung muss durch ausgebildetes Fachpersonal erfolgen.
2. Die Gebrauchsanweisung enthält die Angabe über die Testmethode. Eine Modifikation oder andere Anwendung sowie die Anwendung von automatischen Prozessoren müssen vom Anwender validiert werden und liegen in dessen Verantwortung.
3. Bakteriell verunreinigte Proben können zu unzuverlässigen Testergebnissen führen.
4. Lipämische, hämolytische sowie ikterische Proben (Serum oder Plasma) sollten nur unter Vorbehalt eingesetzt werden, obwohl in unseren Untersuchungen kein negativer Einfluss festgestellt wurde.
5. Serum- oder Plasma- (Heparin EDTA, Citrat) proben, die nach Standard-Labortechniken entnommen sind, sind zur Untersuchung geeignet.
6. Hitzebehandelte Proben dürfen nicht verwendet werden.
7. Ergebnisse zur Untersuchung von Liquorproben liegen nicht vor.
8. Kurzfristige Lagerung der Proben bei $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$, eine längerfristige Lagerung wird bei $\pm 20^{\circ}\text{C}$ empfohlen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.
9. **Hinweise:** In **[SPE|DIL|RUBELLA|IgM]** verdünnte Proben müssen am gleichen Tag im Test eingesetzt werden.

11. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

[WASH|BUF]: Das Konzentrat 1:25 mit aqua dest. verdünnen
z.B. 40 ml **[WASH|BUF|25x]** + 960 ml aqua dest. Waschlösung gut mischen!

Probenverdünnung: Alle Untersuchungsproben **1:101** mit **[SPE|DIL|RUBELLA|IgM]** im Röhrchen verdünnen. z.B. 10 µl Probe + 1 ml **[SPE|DIL|RUBELLA|IgM]**. Die Verdünnung gut mischen!

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig !

Hinweis: Unter Berücksichtigung der Pipettierzeit **wird empfohlen** die **[CUTOFF]** nach jedem sechsten **[MTS]** (oder bei einer Pipettierzeit ≥ 7 min.) erneut anzusetzen, um die nachfolgenden Patientenproben mit dem aktuellen Cut-off-Wert auswerten zu können.

Benötigte Anzahl **[MTS]** den Folienverpackungen entnehmen und in den Halterahmen einsetzen. Nicht benötigte **[MTS]** in den mit Trockenmittel versehenen Plastikbeutel geben, gut verschließen und bei $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$ lagern.

12. PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

- A. 100 µl der Kontrollen und der verdünnten Patientenproben in die Wells pipettieren.
Die Vertiefung A1 für den Blank (100µl **[SUBS|TMB]**) frei lassen.
- B. **[MTS]** mit Folie abkleben und 60 Minuten bei 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) im Brutschrank (mit hoher, relativer Luftfeuchtigkeit oder feuchte Kammer) inkubieren.
- C. Waschen Sie die Wells 4-mal, wie in k. WASHVORGANG beschrieben.
- D. 100 µl gebrauchsfertiges Peroxidase-Konjugat in jede Vertiefung pipettieren.
Die Vertiefung A1 für den Blank (100µl **[SUBS|TMB]**) frei lassen.
- E. **[MTS]** mit Folie abkleben und 30 Minuten bei 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) im Brutschrank (mit hoher, relativer Luftfeuchtigkeit oder feuchte Kammer) inkubieren.
- F. Wiederholen Sie den Waschschrift wie in C.
- G. 100 µl gebrauchsfertiges TMB-Substrat in alle Wells pipettieren.
- H. Platte sofort dunkel stellen und 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
 - I. 100 µl Stopplösung in alle Wells pipettieren. Vorsichtig aufklopfen, um eine gleichmäßige Farbverteilung sicherzustellen, und innerhalb von 10 Minuten messen.
 - J. Stellen Sie vor dem Messen der Platte sicher, dass der Boden frei von Feuchtigkeit ist und keine Luftblasen in den Wells sind. Messen Sie die in den Wells entstandene Farbreaktion bei 450 nm mit einem geeigneten Platten-Photometer. Bei Photometern, die bei 2 Wellenlängen messen können, setzen Sie den Referenzfilter auf 620/630 nm.

Achtung: Die Extinktion (OD) des Blank muss immer von den ODs der Proben und Kontrollen subtrahiert werden.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

Lassen Sie die Wells zwischen den Inkubationen nicht austrocknen. Lassen Sie die Inkubationstemperaturen und -zeiten nicht oberhalb oder unterhalb der angegebenen Bereiche abweichen.

k. WASHVORGANG

Der Waschvorgang kann manuell mit einer Mehrkanal-Pipette oder auf einem automatischen Platten-Waschgerät durchgeführt werden. Die Wells leeren, umdrehen und auf trockenem, saugfähigem Papier aufklopfen. 4-mal Waschen mit einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden (300 µl).

13. TROUBLESHOOTING (PROBLEMLÖSUNGEN)

Bei konsequenter Einhaltung der ELISA Arbeitsvorschrift, sorgfältigem Umgang mit Reagenzien und sorgfältiger Pipettierung von Proben und Reagenzien können die folgenden Fehler / Probleme weitgehend vermieden werden.

Problem	Mögliche Ursachen
Keine Farbentwicklung nach Zugabe des TMB-Substrates	Kein Peroxidase-Konjugat pipettiert, Kontamination des Peroxidase-Konjugates (möglicherweise mit Kontrollseren während des Pipettierens) kann zu einer Inaktivierung führen.
Allgemein zu starke Reaktion	Falsches Peroxidase-Konjugat (z.B. nicht aus dem Original-Testkit), Inkubationszeit zu lang oder Inkubationstemperatur zu hoch, Wasserqualität für die Waschlösung nicht ausreichend (Grad der Deionisierung zu niedrig)
Allgemein zu schwache Reaktion	Falsches Peroxidase-Konjugat (z.B. nicht aus dem Original-Testkit), Inkubationszeit zu kurz oder Inkubationstemperatur zu niedrig
Blank zu hoch	Ungenaues Pipettieren des Probenverdünnungspuffers, kontaminierte Reagenzien, Reagenzien verfallen, überschreiten der Inkubationszeit oder -temperatur, Plattenboden (Streifen) äußerlich verunreinigt (vorsichtig reinigen!)
Falsch positive / negative Proben	Falsche Verdünnung der Proben, bakteriell verunreinigte Proben
Unerklärbare Ausreißer	Kontamination der Pipetten, Spitzen oder Behältern mit Metallen (Eisen, Kupfer etc.), unzureichendes Waschen
Hohe Variation (Intraassay)	Reagenzien sowie Mikrotiterstreifen nicht auf Raumtemperatur vortemperiert. Waschgerät wäscht nicht korrekt!
Hohe Variation (Interassay)	Inkubationsbedingungen nicht konstant (Zeit, Temperatur) hohe Variation der Inkubationstemperaturen, Kontrollen und Proben nicht zur selben Zeit pipettiert (in denselben Intervallen) Pipettier-Reihenfolge prüfen, personenbezogene Variation, Streifen nach dem Waschen ausgetrocknet (unreproduzierbare Ergebnisse)

14. VALIDITÄT DES ASSAYS

Die Kontrollen sollten bei jedem Testlauf mitgeführt werden.

Folgende Kriterien zur Testvalidierung müssen erfüllt sein:

- OD-Wert der Negativen Kontrolle muss < 0,150 sein,
- OD-Wert der Cut-off Kontrolle muss >0,200 sein,
- Ratio der Positiven Kontrolle/ Cut-off-Wert muss $\geq 2,0$ sein,
- OD-Wert des Blank muss < 0,100 sein.

Werden die Sollwerte nicht erreicht, sind die Testergebnisse der Proben invalide und der Test muss wiederholt werden.

15. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A QUALITATIVE BERECHNUNG

Berechnung des "Cut-off-Wertes"

CUT-OFF-WERT = OD-WERT DER **CUTOFF**

GRENZWERTBEREICH = CUT-OFF-WERT $\pm 10\%$

Interpretation der Probenergebnisse:

ERGEBNIS	DEFINITION
negativ -	OD Probe < Cut-off-Wert -10%
grenzwertig	OD Probe \geq Cut-off-Wert -10% OD Probe \leq Cut-off-Wert +10%
positiv +	OD Probe > Cut-off-Wert +10%

Grenzwertige Ergebnisse sollten wiederholt werden. Um unspezifische Reaktionen, die auch zu einem grenzwertigen Ergebnis führen können, auszuschließen, empfehlen wir bei Bestätigung des grenzwertigen Testergebnisses eine **Verlaufskontrolle** anzuschließen.

B BERECHNUNG DER RATIO (Cut-off-Index, COI):

Patientenproben können auch über eine Index-Berechnung beurteilt und quantifiziert werden, wobei der Index-Wert von 1,000 dem Cut-off-Wert entspricht.

RATIO (INDEX) = OD-WERT DER PROBE / CUT-OFF-WERT

Index < 0,9	negatives Ergebnis
Index 0,9 - 1,1	grenzwertiges Ergebnis
Index > 1,1	positives Ergebnis

Diagnostische Bedeutung und Interpretation der Ergebnisse siehe **Seite 1**.

Weitere Informationen finden Sie auch auf unserer Website:

<http://www.viro-immun.de/>

Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole / Símbolos/ Simboli/ Símbolos/ Symboly/ Címkékén/ Συμβολα IVD

	Mikrotiterstreifen/ microtiterstrips/ Microplaques sensibilisées/ placa de microtítulo/ piasta microtítulo/ placa do microtítire/ Mikrotitračni Stripy/ Mikrotitercsíkok/ Ταϊνίες μικροπιλοποίησης
	Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Redidlo na Vzorek/ Mintahígító/ Αραιωτικό Δείγματος
	Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promývaci Roztok 25x/ Mosópuferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x
	Peroxidase-Konjugat / Peroxidase conjugate / Conjugue Peroxidase/Conjugado Peroxidasa / coniugato con perossidasi/ conjugado Peroxidase/ Konjugát Peroxidáza/ Peroxidáz Konjugátum/ Συζευγμένη υπεροξειδάση
	Negative Kontrolle/ negative control/ Contrôle négatif/ control negativo/ controllo positivo/ controle negativo / Negativní kontrola/ Negatív Kontroll/ αρνητικός Μάρτυρας
	Cut-off Kontrolle/ cut-off control/ Contrôle cut-off/ control valor límite/ controllo limitante/ controle interrupção/ cut off kontrola/ cut off kontroll/ μάρτυρας αποκοπήs
	Positive Kontrolle/ positive control/ Contrôle positif/ control positivo/ controllo positivo/ controle positivo/ pozitivní kontrola/ pozitív kontroll/ θετικός μάρτυρας
	TMB-Substrat/ TMB substrate/ substrat TMB/ substrato TMB / Substrát TMB/ TMB Szubsztrát/ Υπόστρωμα TMB
	StoppLösung/ stop solution/ Solution d'arrêt/ solución de parada/ soluzione d'arresto/ solução de parada/ Stop Cínidlo/ Stop Oldat/ Διάλυμα Τερματισμού
	Literatur/ Literature/ Littérature/ Bibliografia/ Bibliografia/ Literatura/ Irodalom/ Βιβλιογραφία
	Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote/ Číslo Šarže/ Lot Szám/ Αριθμός παρτίδας
	In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro Diagnostický Zdravotnický Prostředek/In Vitro Diagnostikum/ Διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro
	Artikel Nr./ reference or order number/ Référence ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commissione/ referência ou número de encomenda/ Katalogové Číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Κωδικός Καταλόγου
	96 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes / Počet Testů/ Vizsgálatok Száma/ Αριθμός εξετάσεων
	Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruções de uso/ Přečtěte si Návod k Použití/ Olvassa el a Használati Utasítást/ Δείτε Οδηγίες Χρήσεως
	Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/ Teplotní Omezení/ Hőmérsékleti Korlátozások/ Θερμοκρασιακά όρια
	Verfallsdatum./ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di decadenza/ Limite de validade/ Datum Expirace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)
	Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ Výrobce/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...



Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12
email: info@viro-immun.de

CE 0123