

Rubella-IgG-ELISA PKS medac

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS) zur
quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern
gegen das Rubella-Virus (Röteln)
in Serum und Liquor

Deutsch/English



HERSTELLER/MANUFACTURER

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB/MARKETING

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-351
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-359

BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-111
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-113

Deutsch: S. 1
English: p. 15

Literatur/References: S./p. 28

Rubella-IgG-ELISA PKS medac

Enzymimmunoassay mit Pipettier-Kontroll-System (PKS) zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Rubella-Virus (Röteln) in Serum und Liquor

Katalog-Nr.: 136-PKS

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

Der Erreger der Röteln, das Rubella-Virus, gehört zur Familie der *Togaviridae* und wird der Gattung *Rubivirus* zugeordnet. Das Rubella-Virus besitzt ein einzelsträngiges RNS-Genom und kommt nur in einem Serotyp vor.

Röteln ist eine überwiegend im Kindesalter auftretende Erkrankung mit in der Regel mildem Verlauf. Sie ist gekennzeichnet durch ein kleinfleckiges Exanthem, begleitet von Lymphknotenschwellungen.

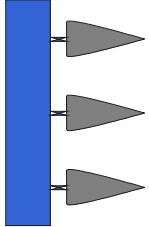
Infektionen mit dem Virus während des ersten Trimenons der Schwangerschaft können eine Infektion des Feten zur Folge haben, was zu schweren Schädigungen führen kann (Embryopathie).

Mit geeigneten Impfstoffen kann eine Immunisierung gegen eine Rötelninfektion erreicht werden. Durch die Impfung wird bei etwa 95 % der Impflinge eine protektive Immunität erzielt. Zur Messung des Impferfolges sowie zur Bestimmung des Immunstatus in der Schwangerschaftsvorsorge stehen verschiedene Testmethoden zur Verfügung.

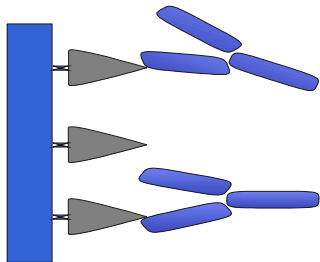
Der Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern mit dem quantitativen Rubella-IgG-ELISA PKS medac ist schnell und einfach durchzuführen. Durch Verwendung von Testkontrollen, welche an dem internationalen Referenzpräparat der WHO kalibriert sind, ist es möglich, eine Bewertung des spezifischen Anti-Rubella-Virus-IgG-Spiegels vorzunehmen. Bei niedrigen Titern im Hämagglutinationshemmtest (HAHT) läßt sich der Immunstatus durch die quantitative Erfassung spezifischer IgG-Antikörper überprüfen.

Der Test kann ebenfalls zur Bestimmung der erregerspezifischen intrathekalen Antikörpersynthese über die Ermittlung eines spezifischen Antikörperindex in Serum-Liquor-Paaren eingesetzt werden.

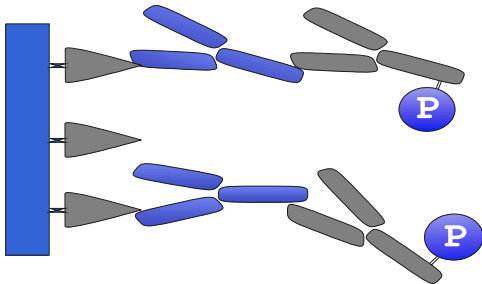
TESTPRINZIP



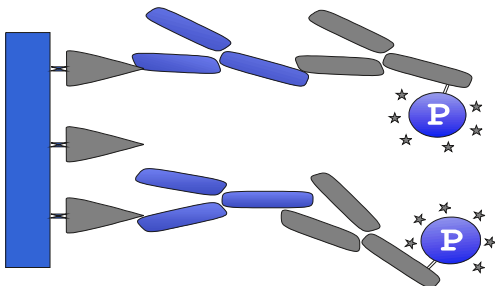
Mit Rubella-Virus-Antigenen beschichtete Mikrotiterplatte.



Rubella-Virus-spezifische Antikörper aus der Patientenprobe binden an das Antigen.



Das Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgG bindet an die IgG-Antikörper (P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Durch das Pipettier-Kontroll-System kann jeder einzelne Pipettierschritt durch Farbumschlag visuell überprüft werden.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.
- ☞ Ein-Punkt-Quantifizierung, keine Standardkurve mehr nötig.
- ☞ Keine zusätzliche Kalibrationskurve für Liquordiagnostik erforderlich.
- ☞ Parallele Bestimmung von Immunstatus und erregerspezifischem Antikörperindex möglich.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR.: 136-PKS

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, rot-markiert (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit Rubella-Virus-Antigen, BSA und pH-Indikator, gebrauchsfertig.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

CAL

Kalibrator: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
5.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
6.

VIR-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
7.

CON

Konjugat: 3 Fläschchen à 5,0 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
8.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
9.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 14 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	6 Wochen
Kontrollen/ Kalibrator	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Konjugat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen s. Tabelle 1.

Hinweis: Die Mikrotitervertiefungen weisen einen leicht grünlichen Farbton auf. Ggf. auftretende grünlich-braune Flecken in den Vertiefungen sind produktionsbedingt und stören den Test nicht.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10 x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10 x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10 x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat, Kalibrator) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle virologischen Tests von medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum und Liquor (zur Untersuchung von Liquor unbedingt Punkt 8 beachten).

4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.

4.3. Die Seren werden 1 : 200 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Wir empfehlen, zunächst eine 1 : 50 Verdünnung herzustellen (z. B. 10 µl Serum + 490 µl Probenverdünnungspuffer) und nur die benötigte Menge 1 : 4 weiterzuverdünnen. Proben außerhalb des Meßbereiches können beliebig weiterverdünnt werden.

4.4. Die Serum-Liquor-Diagnostik ist unter Punkt 8 ausführlich beschrieben.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

- 5.2. Die Vertiefung A1 bleibt frei für die Ermittlung des Leerwertes (s. 6.A.). Jeweils 50 µl der negativen Kontrolle, der positiven Kontrolle sowie der Proben in Einfachbestimmung und 50 µl des Kalibrators in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

Nach dem Pipettieren der Proben (pH-neutrale bzw. basische Flüssigkeiten) kommt es zu einer Blaufärbung. Erfolgt in einer Vertiefung kein Farbumschlag, so ist dies ein Hinweis darauf, daß keine Probe bzw. keine Kontrolle pipettiert wurde.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für maximal 60 min bei 2 - 8 °C gelagert werden.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

- 5.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.5. Konjugat (grün gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl Konjugat pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl Konjugat pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Tests für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.

- 5.6. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.4.).
- 5.8. 50 μ l TMB-Substrat in jede Vertiefung (auch A1) pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.9. Durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung in jede Vertiefung (auch A1) wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen!

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Kalibrator	Probe
Negative Kontrolle	-	50 μ l	-	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 μ l	-	-
Kalibrator	-	-	-	50	-
Probe	-	-	-	-	50 μ l
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 μ l Waschpuffer waschen					
Konjugat	-	50/60 μ l*)	50/60 μ l*)	50/60 μ l *)	50/60 μ l*)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 μ l Waschpuffer waschen					
TMB-Substrat	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren					
Stopplösung	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620-650 nm)					

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
- * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.

* Chargenspezifische Daten

Dem Test liegt ein chargenspezifisches Datenblatt bei. Diesem können folgende Angaben entnommen werden:

- chargenspezifische Standardkurve
- Kurvenparameter a, b und c
- OD-Sollwert des Kalibrators
- unterer Grenzwert für die OD des Kalibrators
- Sollbereich in IU/ml für die positive Kontrolle

* Validitätskriterien

- Der OD-Wert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,150** betragen.
- Der Unit-Wert der **positiven Kontrolle** muß innerhalb des Sollwertbereiches gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
- Der OD-Mittelwert des **Kalibrators** muß oberhalb des Grenzwertes gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
- Zusätzliche Validitätskriterien für Serum-Liquor-Bestimmungen s. 8.

Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

* Korrektur der Meßergebnisse

Die OD-Werte für die positive Kontrolle und die Patientenproben werden wie folgt korrigiert:

$$OD_{\text{korrigiert}} = \frac{OD\text{-Sollwert des Kalibrators}}{OD\text{-Meßwert des Kalibrators}} \times OD_{\text{gemessen}}$$

* Quantifizierung der Meßergebnisse

Für die korrigierten OD-Werte sind die korrespondierenden Konzentrationen in IU/ml aus der Standardkurve auf dem chargenspezifischen Datenblatt zu ermitteln.

Alternativ lassen sich die Konzentrationen auch mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Konzentration [IU/ml]} = b / \left(\frac{a}{OD_{\text{korrigiert}} - c} - 1 \right)$$

Die meisten ELISA-Photometer neuerer Bauart gestatten die Eingabe dieser Formel, so daß eine direkte Auswertung mittels Photometer möglich ist.

Der Meßbereich erstreckt sich von 5 bis 200 IU/ml. Proben mit Unit-Werten unterhalb des Meßbereiches sind als < 5 IU/ml zu bewerten, solche oberhalb als > 200 IU/ml. Diese dürfen nicht extrapoliert werden.

Der Cut-off bezüglich einer bestehenden Immunität liegt bei 15 IU/ml.

Grenzbereich = Cut-off ± 20 % (= 12 bis 18 IU/ml)

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

* Proben mit Unit-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** hinsichtlich einer bestehenden Immunität bewertet.

* Proben mit Unit-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.

Bei Werten innerhalb des Grenzbereiches kann nicht sicher von einer schützenden Immunität ausgegangen werden. Diese Werte sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.

* Proben mit Unit-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** hinsichtlich einer bestehenden Immunität bewertet.

* Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.

* Sehr stark erhöhte Lipidwerte können bei positiven Proben die gemessene Antikörperkonzentration verfälschen. Hohe Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen beeinflussen die Testergebnisse nicht.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

350 Patientenseren, davon 100 im Röteln-Hämagglutinationshemmtest negative und 250 in einem Referenz-ELISA positive, wurden im Rubella-IgG-ELISA PKS medac gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Vier-Felder-Tafel dargestellt.

Rubella-IgG-ELISA PKS	Referenztest	
	negativ	positiv
	negativ	99
positiv	1*	250

*Probe wurde als grenzwertig bestimmt

Sensitivität = 100 %
Spezifität = 99,00 %

Positiver Vorhersagewert: 99,60 %
Negativer Vorhersagewert: 100 %

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW OD	S	VK (%)	n		MW IU	S	VK (%)	n
NK	0,029	0,002	7	22	PK	13,6	0,8	6	13
PK	0,338	0,014	4	22	Nr. 2	17,9	1,5	8	13
Kal	0,952	0,046	5	22	Nr. 3	90,4	11,3	13	13
Nr. 1	1,764	0,070	4	22	Nr. 4	145,5	18,7	13	13

NK = Negative Kontrolle; PK = Positive Kontrolle; Kal = Kalibrator

8. LIQUORDIAGNOSTIK

Der Nachweis einer Rubella-spezifischen Antikörpersynthese im ZNS im Rahmen der Liquordiagnostik ist Bestandteil der differentialdiagnostischen Abklärung akuter Infektionen wie auch chronischer Erkrankungen mit ZNS-Beteiligung.

Neben Pilzen und Bakterien zeichnen auch verschiedene Viren für Infektionen mit ZNS-Beteiligung verantwortlich. Außerdem findet man bei chronischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose in etwa 95 % aller Fälle hohe Antikörperindizes für Masern, Röteln und/oder Varizella-Zoster.

Die Bestimmung einer Rubella-spezifischen intrathekalen Antikörper-synthese erfolgt durch die Ermittlung des Antikörperindex (AI) nach Reiber (Reiber 1987, 1999). Für die Berechnung des AI müssen die folgenden Voraussetzungen erfüllt sein:

- Ermittlung des Albuminquotienten (Q_{alb}) zur Beurteilung der Schrankenfunktion und Berechnung des Limes-Wertes bei erhöhtem IgG-Quotienten ($Q_{ges} > Q_{lim}$)
- Ermittlung des Gesamt-IgG-Quotienten (Q_{ges})

8.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

8.1.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum-Liquor-Paaren.

8.1.2. Eine Vorbehandlung der Seren und Liquores, wie z.B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von humanen Erythrozyten sein.

8.1.3. Serum
Neben der 1 : 200-Verdünnung zur Bestimmung des Serostatus werden die Seren 1 : 1500 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zur Berechnung des AI wird die Verdünnung gewählt, deren IU-Wert innerhalb des Meßbereichs liegt (s. 6.A. und 8.2.). Liegen die IU-Werte für beide Verdünnungen innerhalb des Meßbereichs von 5 - 200 IU, ist für die AI-Berechnung der IU-Wert der 1 : 1500-Verdünnung zu verwenden. Liegen die IU-Werte für beide Verdünnungen oberhalb von 200 IU, muß die Probe weiterverdünnt werden.

8.1.4. Liquor
Die Liquores werden standardmäßig 1 : 5 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Liegt die gemessene Antikörperkonzentration außerhalb des Meßbereichs, muß die Probe weiterverdünnt oder in einer geringeren Verdünnungsstufe (max. 1 : 2) erneut gemessen werden.

Serum und Liquor immer parallel im gleichen Testlauf bestimmen (auch bei Wiederholungsmessungen)!

8.2. ARBEITSVORSCHRIFT

Der weitere Testansatz für die Rubella-IgG-Bestimmung in Serum-Liquor-Paaren erfolgt gemäß Punkt 5.A.

8.3. BESTIMMUNG VON GESAMT-IgG UND ALBUMIN-GEHALT

Zusätzlich zu den Röteln-spezifischen IgG-Bestimmungen sind der jeweils korrespondierende Gesamt-IgG-Gehalt und der Albumin-Gehalt in Serum und Liquor zu bestimmen.

8.4. TESTBEURTEILUNG/VALIDITÄT

* Validität

Es gelten die unter Punkt 6.A. angegebenen Validitätskriterien.

Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

Zusätzlich gilt für die Liquordiagnostik:

- Seren mit einem Antikörpergehalt < 5 IU in der 1 : 200-Verdünnung werden als seronegativ betrachtet. In diesem Falle kann kein Antikörperindex bestimmt werden.
- In äußerst seltenen Fällen sind bei seronegativen Patienten auf Grund Röteln-bedingter Enzephalopathien intrathekale Antikörper nachweisbar.
- Der Meßbereich für Liquor erstreckt sich von 2 - 200 IU.
- Liquores, die in der Verdünnung von 1 : 5 und bei **positivem Serostatus** unterhalb des Meßbereichs liegen, sollten in einer geringeren Verdünnung (maximal 1 : 2) wiederholt gemessen werden.

* Bewertung

- Berechnung der IU-Werte s. 6.A.
- Berechnung des erregerspezifischen IgG-Quotienten (Q_{spez})

$$Q_{spez} = \frac{\text{IU Liquor} \times \text{Verdünnung Liquor}}{\text{IU Serum} \times \text{Verdünnung Serum}}$$

- Berechnung des Antikörperindex

Der erregerspezifische Index errechnet sich dann nach den Formeln:

1. $AI = Q_{spez}/Q_{ges}$ (für $Q_{ges} < Q_{lim}$)

2. $AI = Q_{spez}/Q_{lim}$ (für $Q_{ges} > Q_{lim}$)

3. $Q_{lim} = 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$

8.5. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- * AI-Werte von 0,6 - 1,3 gelten als Normalbereich.
- * AI-Werte $> 1,3$ und $\leq 1,5$ gelten als grenzwertig.
- * **Der pathologische Bereich ist festgelegt mit AI $> 1,5$.**
- * AI-Werte $< 0,6$ weisen auf analytische Fehler hin und sind nicht interpretierbar.
- * Liquordiagnostische Entscheidungskriterien für eine akute, aktive Erkrankung des ZNS sind eine erhöhte Zellzahl und ein erhöhter Albumin-Quotient als Ausdruck einer entzündlich bedingten Liquorflußbehinderung.
- * Erhöhte Antikörperindizes sind allein kein sicherer Beweis für die akute Phase einer infektiösen ZNS-Erkrankung, da Antikörper auch intrathekal über längere Zeiträume persistieren und polyspezifische ZNS-eigene Antikörpersynthesen vorkommen können. Gegebenenfalls ist eine signifikante Änderung des AI-Wertes über Zweitbestimmungen von Serum-Liquor-Paaren für die Beurteilung einer ZNS-Infektion angezeigt. Dazu ist eine weitere in einem klinisch sinnvollen zeitlichen Abstand erfolgende Probenentnahme erforderlich, die auf Grund klinischer Gesichtspunkte entschieden werden muß.

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallentsorgungsunternehmen informieren über die Entsorgungsmöglichkeiten.

LITERATURHINWEISE

s. S. 28

Ausgabedatum: 30.08.2006

Rubella-IgG-ELISA PCS medac

Enzyme immunoassay with Pipetting Control System (PCS) for the quantitative detection of IgG antibodies to rubella virus in serum and cerebrospinal fluid (CSF)

Cat. no.: 136-PKS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

The pathogen causing rubella (German measles), rubella virus, belongs to the family of *Togaviridae* and is assigned to the genus *Rubivirus*. The rubella virus has a single-stranded RNA genome and occurs only in one serotype.

Rubella appears mainly in childhood and takes normally a mild course. The disease is characterised by a small-spotted exanthema and is accompanied by lymphadenosis.

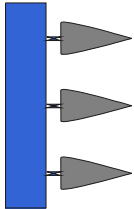
During the first trimenon of pregnancy, infections with the rubella virus can cause a foetal infection, which can lead to irreversible embryofoetal damages.

An immunization against a rubella virus infection can be achieved with suitable vaccines. With an immunization a protective immunity can be achieved in about 95 % of the vaccinees. Different test methods are available to measure the success of the vaccination as well as to determine the status of immunity.

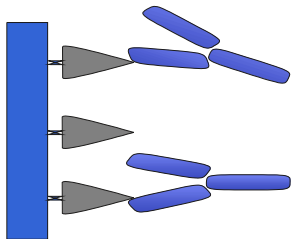
The detection of rubella virus-specific IgG antibodies using the quantitative Rubella-IgG-ELISA PCS medac can be carried out fast and easily. By using test controls, which are calibrated against the international reference of the WHO, it is possible to quantify the specific anti-rubella virus IgG titer. Low titers in a hemagglutination inhibition assay (HAI) can be controlled by the quantitative detection of specific IgG antibodies.

The test is also suitable for the detection of pathogen-specific intrathecal antibody synthesis calculating a specific antibody index in serum-CSF pairs.

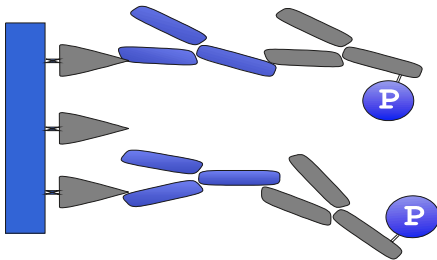
TEST PRINCIPLE



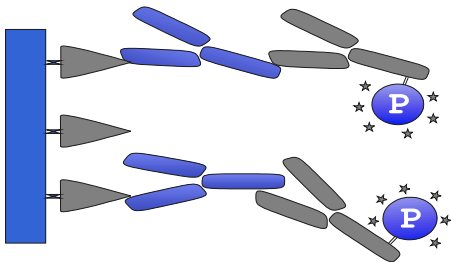
The plate is coated with rubella virus antigen.



The rubella virus-specific antibodies from the specimen are selectively bound to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies bind to the rubella-specific antibodies (P = peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ☞ The Pipetting Control System allows to monitor visually each pipetting step through colour changes.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.
- ☞ Suitable for automation on open ELISA devices.
- ☞ One-point quantification, no standard curve needed.
- ☞ No additional calibration curve for diagnostic of CSF needed.
- ☞ Suitable for parallel detection of immune status and pathogen-specific antibody index.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 136-PKS

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells, red-coded (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with rubella virus antigen, BSA and pH indicator, ready to use.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
4.

CAL

Calibrator: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
5.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
6.

VIR-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7.2 - 7.4, ready to use, contains ProClin™ 300.
7.

CON

Conjugate: 3 vials with 5.0 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
8.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
9.

STOP

Stop solution: 2 vials with 14 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2...8°C	until expiry date
Microplate	opened	2...8°C in bag with desiccant	6 weeks
Controls/ Calibrator	opened	2...8°C	6 weeks
Wash buffer	diluted	2...8°C	6 weeks
Sample diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Conjugate	opened	2...8°C	6 weeks
TMB-substrate	opened	2...8°C	6 weeks
Stop solution	opened	2...8°C	until expiry date

Do not use the reagents after the expiry date.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Water for injection (H₂O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated in table 1.

Note: The microplate wells have a light green colour. Eventually occurring greenish brown stains inside the wells are due to the production process and do not influence the test performance.

3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10 x) with nine volumes of water for injection (e.g. 50 ml wash buffer (10 x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

Crystals in the wash buffer (10 x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate, calibrator) from different kit lots.

In contrast to that sample diluent, wash buffer, TMB-substrate and stop solution are generally exchangeable in all virological ELISA medac.

Reagents from other manufacturers must not be used in general.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed.

4. SPECIMEN

4.1. The test is suitable for serum and CSF samples (for the detection of CSF, see 8.).

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

4.3. Sera have to be diluted 1 : 200 with sample diluent. We recommend to prepare an initial dilution of 1 : 50 (e.g. 10 µl serum + 490 µl sample diluent). For further 1 : 4 dilution just prepare the volume needed. Samples outside the measuring range can be diluted further.

4.4 **The diagnostic investigation of serum-CSF pairs is detailed described under 8.**

5.A. TEST PROCEDURE

5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be pre-washed.

- 5.2. Leave well A1 empty as blank (see 6.A.). Add 50 µl each of the negative control, the positive control as well as the diluted samples in single determination, and 50 µl of the calibrator in duplicate to the wells.

After pipetting the samples (pH neutral or basic fluid) the wells turn blue. A missing colour change in one well indicates that no sample or control has been added.

If necessary, the microplate wells can be kept in a humid chamber up to 60 min at 2 - 8 °C before proceeding.

- 5.3. Incubate the microplate wells for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.4. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

- 5.5. Add conjugate (coloured green) to each well (except A1).

50 µl of conjugate have to be pipetted into the wells if the test is done manually.

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of conjugate have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.

The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

- 5.6. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.4.).
- 5.8. Add 50 µl of TMB-substrate to each well (also A1) and incubate for 30 min (\pm 2 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.
- 5.9. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well (also A1). Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the stop solution!

5.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Calibrator	Sample
Neg. control	-	50 µl	-	-	-
Pos. control	-	-	50 µl	-	-
Calibrator	-	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37°C, wash 3 x with 200 µl wash buffer					
Conjugate	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer					
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark					
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)					

*) manual/automatic procedure (see 5.6.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620 - 650 nm).
- * Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.
- * Lot-specific data
 The lot-specific data sheet provided with the kit contains the following information:
 - Lot-specific calibration curve
 - Curve parameters a, b and c
 - Nominal OD value of the calibrator
 - Lower OD limit of the calibrator
 - Nominal concentration range (IU/ml) of the positive control
- * Validity criteria
 - The OD value of the **negative control** has to be < **0.150**.

- The unit value of the **positive control** has to be within the nominal range indicated in the lot-specific data sheet.
- The mean OD value of the **calibrator** has to be above the lower OD limit indicated in the lot-specific data sheet.
- Additional validity criteria for the detection of serum-CSF pairs see 8.

Repeat the run if the results do not meet the specification!

* Correction of the results

The measured OD values of the positive control and the samples have to be corrected as follows:

$$OD_{\text{corrected}} = \frac{\text{Nominal OD value of the calibrator}}{\text{Measured OD value of the calibrator}} \times OD_{\text{measured}}$$

* Quantification of the results

The corresponding concentrations of the corrected OD values in IU/ml can be read from the lot-specific calibration curve (see lot-specific data sheet).

Alternatively, the concentrations can be calculated using the following formula:

$$\text{Concentration [IU/ml]} = b / \left(\frac{a}{OD_{\text{corrected}} - c} - 1 \right)$$

Most of the new ELISA readers allow to program the formula, thus enabling an automated data processing.

The measuring range spans from 5 to 200 IU/ml. Samples below this range have to be interpreted as < 5 IU/ml, those above as > 200 IU/ml. These values must not be extrapolated.

The cut-off for immunity is 15 IU/ml.

Grey zone = cut-off ± 20 % (= 12 to 18 IU/ml).

6.B. INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD

- * Samples with Unit values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE** with regard to immunity.
- * Samples with Unit values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.

Due to the fact that a protective immunity is not given with equivocal results these samples should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.

- * Samples with Unit values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE** with regard to immunity.
- * The results should always be interpreted in connection with clinical data and additional diagnostic parameters.
- * Very high concentrations of lipids in positive samples can influence the measured concentration of antibodies. High concentrations of hemoglobin and bilirubin do not influence the test results.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SENSITIVITY AND SPECIFICITY

350 sera from patients, 100 of them detected as negative with the rubella hemagglutination inhibition assay, and 250 of them detected as positive with a reference ELISA, were measured with the Rubella-IgG-ELISA PCS medac. The results obtained are shown in the table below.

	Reference test	
	negative	positive
Rubella-IgG-ELISA PCS	negative	0
	99	250
	1*	

* Sample was detected as equivocal

Sensitivity = 100 %
 Specificity = 99.00 %

Positive predictive value: 99.60 %
 Negative predictive value: 100 %

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation			
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean IU	SD	CV (%)	n
NC	0.029	0.002	7	22	PC	13.6	0.8	6	13
PC	0.338	0.014	4	22	N° 2	17.9	1.5	8	13
Cal	0.952	0.046	5	22	N° 3	90.4	11.3	13	13
N° 1	1.764	0.070	4	22	N° 4	145.5	18.7	13	13

NC = Negative Control; PC = Positive Control; Cal = Calibrator

8. DIAGNOSTIC INVESTIGATIONS OF CEREBROSPINAL FLUID (CSF)

The detection of rubella-specific antibody synthesis in the central nervous system (CNS) during the diagnostic investigation of cerebrospinal fluid is an essential part of the differential diagnostic of acute infections, and also of chronic conditions involving the CNS.

Apart from fungi and bacteria, there are numerous viruses that can be responsible for infections with CNS involvement. Furthermore, in chronic diseases such as multiple sclerosis, high antibody indices for measles, rubella and/or varicella-zoster are found in about 95% of all cases.

The identification of rubella-specific intrathecal antibody synthesis is performed by estimation of the antibody index (AI) according to Reiber (Reiber 1987, 1999). In order to calculate the AI the following conditions must be fulfilled:

- estimation of the albumin quotient (Q_{alb}) so as to assess the function of the blood-brain-barrier and to calculate the Limes value in patients with elevated IgG quotients ($Q_{tot} > Q_{lim}$)
- estimation of the total IgG quotient (Q_{tot})

8.1. SPECIMEN

8.1.1. The test is suitable for serum-CSF paired samples.

8.1.2. Pre-treatment of sera and CSF samples, e.g., inactivation, is not necessary. However they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

8.1.3. Serum
In addition to the 1 : 200 dilution for determination of serostatus, the sera are diluted 1 : 1500 with sample diluent. To calculate the AI, a dilution should be chosen so that its IU value will lie inside the assay range (see 6.A. and 8.2.). If the IU values for both dilutions are within the assay range of 5 - 200 IU, the IU value of the 1 : 1500 dilution should be chosen to calculate the AI. If the IU values for both dilutions are above 200 IU, the sample has to be further diluted.

8.1.4. Cerebrospinal fluid
The CSF samples are diluted to a standard dilution 1 : 5 with sample diluent. If the measured antibody concentration is outside the measuring range, the sample has to be further diluted, or has to be retested in a lesser dilution (max. 1 : 2).

Serum and cerebrospinal fluid have always to be assayed in parallel in the same test run (this also applies to repeat measurements)!

8.2. TEST PROCEDURE

The further test setup for rubella-IgG determination in serum-CSF pairs is performed as described under 5.A.

8.3. DETERMINATION OF TOTAL IgG AND ALBUMIN CONCENTRATIONS

In addition to the rubella-specific IgG determinations, in each sample pair the total IgG concentration and the albumin concentration in serum and CSF have to be determined.

8.4. CALCULATION OF RESULTS/VALIDITY

* Validity
The validity criteria specified under 6.A. are applicable.

Repeat the run if the results do not meet the specification.

The following points also apply to CSF investigations:

- Sera with an antibody content < 5 IU in a dilution of 1 : 200 are considered as seronegative. In such cases the antibody index cannot be determined.

- In extremely rare cases, sero-negative patients may have demonstrable intrathecal antibodies because of rubella-associated encephalopathies.
- The assay range for CSF extends from 2 - 200 IU.
- CSF samples from patients with **positive serostatus** which at the dilution of 1 : 5 are below the assay range, should be retested in a lesser dilution (maximum 1 : 2).

* Evaluation

- Calculation of IU values see 6.A.
- Calculation of the pathogen-specific IgG quotient (Q_{spec}).

$$Q_{spec} = \frac{IU\ CSF \quad \times \quad dilution\ CSF}{IU\ serum \quad \times \quad dilution\ serum}$$

- Calculation of the antibody index

The pathogen-specific index is calculated from the fomulae:

1. $AI = Q_{spec}/Q_{tot}$ (for $Q_{tot} < Q_{lim}$)
2. $AI = Q_{spec}/Q_{lim}$ (for $Q_{tot} > Q_{lim}$)
3. $Q_{lim} = 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$

8.5. INTERPRETATION OF RESULTS

- * AI values from 0.6 - 1.3 are regarded as the normal range.
- * AI values > 1.3 and ≤ 1.5 are regarded as borderline.
- * **The abnormal range is defined as AI > 1.5 .**
- * AI values < 0.6 point to analytical errors and cannot be interpreted.
- * The CSF diagnostic criteria for an acute, active disease of the CNS are raised cell count and a raised albumin quotient. These reflect obstruction to CSF flow due to some inflammatory condition.
- * Elevated antibody indices are not reliable evidence of the acute phase of an infective CNS disease, because antibodies, even intrathecally, may persist for long periods, and because polyspecific CNS-intrinsic antibody synthesis may occur. In some circumstances it may be advisable to look for a significant change in the AI value by testing second paired serum-CSF samples. For this purpose further sample collection will be necessary and should be performed after a time interval chosen in the light of the clinical circumstances.

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

REFERENCES

see page 28

Date of issue: 30.08.2006

LITERATUR/REFERENCES

- Enders, G.: Röteln. Fortschr. Klin. Virol. München, 157 - 177, (1986).
- Hermann, K.L.: Available Rubella serological tests. Rev. Infect. Dis. 7, 108 - 112, (1985).
- Reiber, H. and Felgenhauer, K.: Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system., Clin Chim Acta, 319 - 328, (1987).
- Reiber, H.: Liquordiagnostik, in: Klinische Neurologie, Berlitz, P. (Hrsg.), Springer Verlag, Heidelberg, 148 - 177, (1999).
- Pustowoit, B., Hofmann, J. und Trauer, H.: Rötelnvirus, in: Diagnostische Bibliothek, Bd. 1, Virusdiagnostik, Porstmann, T. (Hrsg.), Blackwell Wissenschafts-Verlag, 499 - 515, (1996).
- Selb, B.: Rötelnvirus, in: Medizinische Virusdiagnostik, Selb, B. (Hrsg.), Umschau Verlag, 198 - 202, (1992).
- Wolinsky, J.: Rubella, in: Virology, 2. Edition, Field, B. N., Kipe, D. M. et al. (Eds.), Raven Press, Ltd., New York, (1990).