

## Rubella-IgM-ELA Test PKS medac

---

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS)  
zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das  
Rubella-Virus (Röteln)

Deutsch/English





## **Rubella-IgM-ELA Test PKS medac**

Enzymimmunoassay mit Pipettier-Kontroll-System (PKS) zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Rubella-Virus (Röteln)

Katalog-Nr.: 135-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.

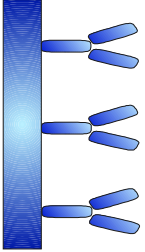
Röteln ist eine überwiegend im Kindesalter auftretende Erkrankung mit in der Regel mildem Verlauf. Sie ist gekennzeichnet durch ein kleinfleckiges Exanthem, begleitet von Lymphknotenschwellungen.

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).

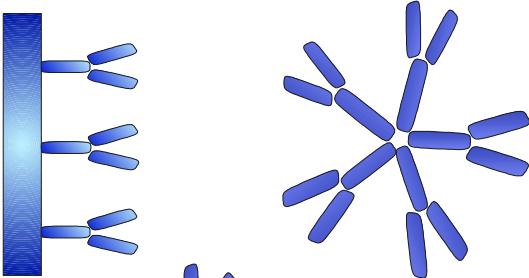
Rubella-Virus-spezifische IgM-Antikörper sind bereits 4 bis 30 Tage nach Ausbruch des Exanthems nachweisbar und persistieren danach 1 bis 4 Monate. Daher ist die IgM-Bestimmung mit dem Rubella-IgM-ELA Test PKS medac eine geeignete Methode zur Diagnose der akuten Rötelninfektion.

Vereinzelt kann die IgM-Antwort bis zu einem Jahr persistieren bzw. auch völlig ausbleiben. Deshalb ist jeder einzelne IgM-Befund nur zusammen mit den Anamnesedaten der Rötelninfektion und evtl. weiteren Untersuchungen zu interpretieren.

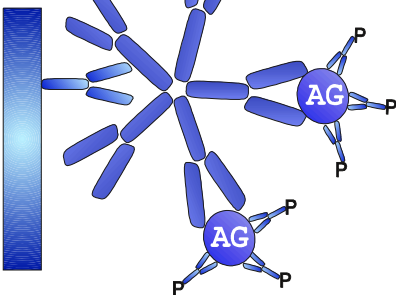
## TESTPRINZIP



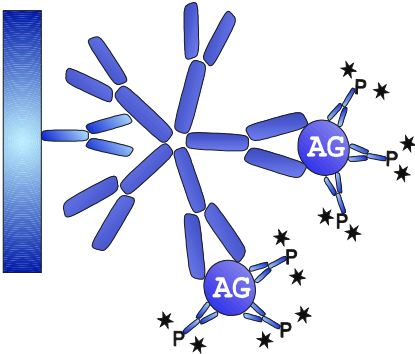
Mit Anti-Human-IgM beschichtete Mikrotiterplatte.



Die IgM-Fraktion aus dem Patientenserum wird auf der Mikrotiterplatte gebunden.



Der Komplex aus mAk-Peroxidase-Konjugat und Rubella-Antigen bindet spezifisch an die Anti-Rubella-Virus-IgM-Antikörper (AG = Antigen, P = Peroxidase).



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

### Testvorteile

- ☞ Keine unspezifischen Reaktionen und falsch positiven Ergebnisse durch Rheumafaktoren.
- ☞ Keine Blockade der IgM-Antikörper durch hohe IgG-Titer.
- ☞ 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.

## PACKUNGSINHALT

### KAT.-NR.: 135-PKS

1. **MTP**  
Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörpern, 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 BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4. **WB**  
Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x) pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5. **VIR-DIL**  
Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
6. **ANTIGEN-DIL**  
Antigenverdünnungspuffer: 1 Fläschchen à 14 ml Tris/NaCl, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
7. **ANTIGEN**  
Antigen: 4 Fläschchen à 3,0 ml, Rubella-Virus-Antigen/BSA, lyophilisiert.
8. **CON**  
Konjugat: 1 Fläschchen à 0,3 ml, Anti-Rubella-Virus-IgG-Antikörper, monoklonal (Maus), HRP-konjugiert, rot gefärbt, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
9. **TMB**  
TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
10. **STOP**  
Stopplösung: 2 Fläschchen à 14 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 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	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Antigenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Antigen-Konjugat- Mischung	gebrauchs- fertig	2...8 °C	1 Woche
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 (H<sub>2</sub>O 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.**

### 3.3. Antigen-Konjugat-Mischung

Das lyophilisierte Antigen wird mit jeweils 3,0 ml **Antigenverdünnungspuffer** aufgelöst. Die verschlossenen Fläschchen werden leicht geschwenkt, so daß auch am Verschluß haftende Partikel in Lösung gebracht werden. 60 min vor Gebrauch werden 50 µl Konjugat zu 3,0 ml Antigen pipettiert.

**Nach dem Auflösen und der Zugabe des Konjugats ist die Antigen-Konjugat-Mischung rot gefärbt und gebrauchsfertig.**

**Die gebrauchsfertige Antigen-Konjugat-Mischung ist 1 Woche bei 2 - 8 °C lagerfähig (s. 1.)!**

**Achtung! Nicht einfrieren!**

**Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat, Antigen, Antigenverdünnungspuffer) 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.
- 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 : 100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zur Titer-Bestimmung können die Proben beliebig weiterverdünnt werden.

#### **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 Proben sowie in Doppelbestimmung negative Kontrolle und positive Kontrolle 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 ( $\pm$  5 min) bei 37 °C ( $\pm$  1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.4. Ansetzen der Antigen-Konjugat-Mischung (s. 3.3.).
- 5.5. 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!**



- 5.6. Antigen-Konjugat-Mischung (rot gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

**Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl Antigen-Konjugat-Mischung pro Vertiefung pipettiert.**

**Bitte beachten:**

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

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

- 5.7. Erneut 60 min ( $\pm$  5 min) bei 37 °C ( $\pm$  1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.8. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.5.).
- 5.9. 50 µl 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.
- 5.10. Durch Zugabe von 100 µl 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	Probe
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
Antigen-Konjugat- Mischung	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620-650 nm)				

\*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.6.)

## 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.
- \* Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,100** betragen.  
Der OD-Mittelwert der **positiven Kontrolle** muß **> 0,800** betragen.
- \* **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,320**
- \* **Grenzbereich = Cut-off ± 10 %**

## 6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

- \* Proben mit OD-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.
- \* Proben mit OD-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.

Werte im Grenzbereich 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 OD-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.
- \* Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- \* In seltenen Fällen kann es durch ANA-enthaltende Seren zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.
- \* Sehr stark erhöhte Lipidwerte führen zu einer Erhöhung der OD-Werte, wodurch das Ergebnis verfälscht werden kann. 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**

Insgesamt 466 Seren von gesunden Blutspendern, von Patienten mit Verdacht auf eine akute Rötelninfektion sowie mit IgM-Antikörpern gegen andere Viren (CMV, HSV, VZV, EBV, Parvo B19) und ANA- bzw. RF-haltige Seren wurden im Vergleich zu einem hochspezifischen ELISA als Referenztest, welcher in der Routine eingesetzt wird, getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Vier-Felder-Tafel dargestellt.

	<b>Referenztest</b>	
	negativ	positiv
<b>Rubella-IgM-ELA Test PKS medac</b>	negativ	positiv
	360	1
	3	102

Sensitivität = 99,03 %  
Spezifität = 99,17 %

Positiver Vorhersagewert: 97,14 %  
Negativer Vorhersagewert: 99,72 %

## **7.B. PRÄZISION**

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW OD	S	VK (%)	n		MW OD	S	VK (%)	n
NK	0,025	0,004	17	18	NK	0,024	0,005	19	11
PK	1,235	0,031	3	21	PK	0,962	0,057	6	11
Nr. 1	1,400	0,036	3	21	Nr. 4	0,922	0,054	6	11
Nr. 2	0,930	0,026	3	21	Nr. 5	0,230	0,008	3	11
Nr. 3	0,488	0,019	4	21	Nr. 6	1,159	0,066	6	11
					Nr. 7	0,426	0,035	8	11

NK = Negative Kontrolle; PK = Positive Kontrolle

### **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 Arbeitsvorschriften 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. 22

**Ausgabedatum: 17.07.2007**

<b>Rubella-IgM-ELA Test PKS medac</b>
Enzyme immunoassay with Pipetting Control System (PKS) for the detection of IgM antibodies to rubella virus

Cat. no.: 135-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.

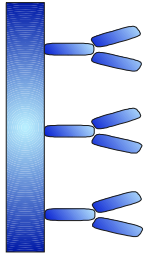
Rubella appears mainly in childhood and takes normally a mild course. The disease is characterised by a small-spotted exanthema and is accompanied by lymphadenosis.

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

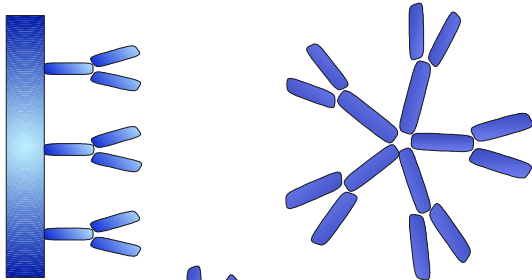
Rubella virus-specific IgM antibodies can be detected 4 to 30 days after eruption of the rash and persist for 1 to 4 months. Therefore the IgM determination with the Rubella-IgM-ELA test PCS medac is a suitable method for diagnosis of an acute rubella virus infection.

Occasionally, IgM antibodies can persist up to one year or do not appear at all. Therefore the IgM result should always be interpreted together with anamnestic data and possible further examinations of the rubella virus infection.

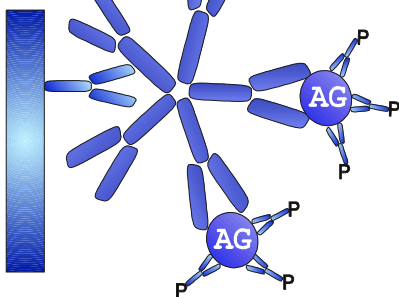
## TEST PRINCIPLE



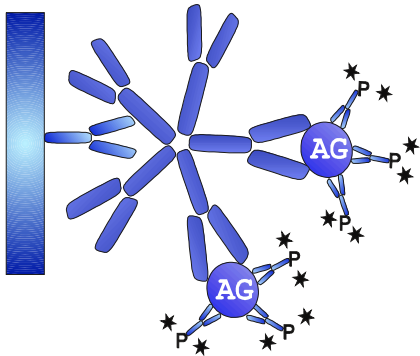
The plate is coated with anti-human IgM immunoglobulin.



IgM of the specimen is selectively bound to the wells.



The complex of mAb-peroxidase-conjugate and rubella virus antigen binds to rubella virus-specific IgM antibodies (AG = antigen, 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

- ☞ No unspecific reactions and no false positive results caused by rheumatoid factors.
- ☞ No blocking of IgM antibodies by high IgG titer.
- ☞ 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.

## **KIT CONTENTS**

**Cat. no.: 135-PKS**

1. **MTP**  
Microplate: 12 x 8 wells (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with goat anti-human IgM immunoglobulin, 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, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
4. **WB**  
Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7.2 - 7.4 contains ProClin™ 300.
5. **VIR-DIL**  
Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7.2 - 7.4, ready to use, contains ProClin™ 300.
6. **ANTIGEN-DIL**  
Antigen diluent: 1 vial with 14 ml Tris/NaCl, ready to use, contains ProClin™ 300.
7. **ANTIGEN**  
Antigen: 4 vials with 3.0 ml each, rubella virus antigen/BSA, lyophilised.
8. **CON**  
Conjugate: 1 vial with 0.3 ml, anti-rubella virus IgG antibody, monoclonal (mouse), HRP-conjugated, stained red, ready to use, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
9. **TMB**  
TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
10. **STOP**  
Stop solution: 2 vials with 14 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ready to use.



## **1. STORAGE AND STABILITY**

<b>MATERIAL/REAGENT</b>	<b>STATE</b>	<b>STORAGE</b>	<b>STABILITY</b>
Test kit	unopened	2...8°C	until expiry date
Microplate	opened	2...8°C in bag with desiccant	6 weeks
Controls	opened	2...8°C	6 weeks
Wash buffer	diluted	2...8°C	6 weeks
Sample diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Antigen diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Antigen-conjugate mixture	ready to use	2...8°C	1 week
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 (H<sub>2</sub>O 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.**

### 3.3. Antigen-conjugate mixture

Reconstitute the lyophilised antigen with 3.0 ml **antigen diluent** each. Mix gently and take care that particles sticking to the closure are also dissolved. Add 50 µl conjugate to 3.0 ml antigen 60 min before use.

**After reconstitution of the antigen and addition of the conjugate, the antigen-conjugate mixture has a red colour and is ready to use.**

**The ready-to-use antigen-conjugate mixture can be stored at 2 - 8 °C for one week (see 1.)! Attention! Do not freeze!**

**Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate, antigen, antigen diluent) from different 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 samples.

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 : 100 with sample diluent. They can be diluted further for titer determination.

## **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 diluted sample as well as negative control and positive control in duplicates 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. Prepare the antigen-conjugate mixture (see 3.3.).
- 5.5. 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!**

- 5.6. Add antigen-conjugate mixture (coloured red) to each well (except A1).

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

### **Please note:**

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

**The suitability of the test 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.**

- 5.7. Incubate again for 60 min ( $\pm$  5 min) at 37 °C ( $\pm$  1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.8. After incubation wash microplate wells again (see 5.5.).
- 5.9. Add 50  $\mu$ l 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.
- 5.10. Stop the reaction by adding 100  $\mu$ l 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 WORKING PROCEDURE**

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Sample
Negative control	-	50 $\mu$ l	-	-
Positive control	-	-	50	-
Sample	-	-	-	50 $\mu$ l
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 $\mu$ l wash buffer				
Antigen-conjugate mixture	-	50/60 $\mu$ l *)	50/60 $\mu$ l *)	50/60 $\mu$ l *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 $\mu$ l wash buffer				
TMB-substrate	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50
Incubate for 30 minutes at 37 °C in the dark				
Stop solution	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
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.
- \* The mean OD value of the **negative Control** has to be **< 0.100**.  
The mean OD value of the **positive Control** has to be **> 0.800**.
- \* **Cut-off = mean OD value of the negative control + 0.320**
- \* **Grey zone = Cut-off ± 10 %**

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

- \* Samples with OD values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE**.
- \* Samples with OD values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.  
  
These should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- \* Samples with OD values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE**.
- \* The results should always be interpreted in connection with clinical data and additional diagnostic parameters.
- \* In rare cases ANA-positive specimen can cause false-positive results.
- \* Very high concentrations of lipids may lead to higher OD values, which can influence the test result.  
High concentrations of Hemoglobin or 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**

A total of 466 serum specimen including healthy blood donors, patients with suspected acute rubella virus infections, with IgM antibodies to other viruses (CMV, HSV, VZV, EBV, Parvo B19), as well as sera containing ANA and rheumatoid factor were tested with the Rubella-IgM-ELA test PCS medac in comparison to a highly specific ELISA that is used routinely in laboratories. The results obtained are shown in the table below.

	Reference test	
	negative	positive
Rubella-IgM-ELA Test PKS medac	360	1
	3	102

Sensitivity = 99.03 %  
 Specificity = 99.14 %

Positive predictive value: 97.14 %  
 Negative predictive value: 99.72 %

**7.B. PRECISION**

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation			
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)	n
NC	0.025	0.004	17	18	NC	0.024	0.005	19	11
PC	1.235	0.031	3	21	PC	0.962	0.057	6	11
N <sup>0</sup> 1	1.400	0.036	3	21	N <sup>0</sup> 4	0.922	0.054	6	11
N <sup>0</sup> 2	0.930	0.026	3	21	N <sup>0</sup> 5	0.230	0.008	3	11
N <sup>0</sup> 3	0.488	0.019	4	21	N <sup>0</sup> 6	1.159	0.066	6	11
					N <sup>0</sup> 7	0.426	0.035	8	11

NC = Negative Control; PC = Positive Control

## **GENERAL HANDLING ADVICES**

- \* Do not exchange the vials and their screw caps in order to avoid cross contamination.
- \* The reagents have to be sealed immediately after use in order 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 p. 22

**Date of issue: 17.07.2007**

## 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).

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).

Thomas, H.-I., Morgan-Capner, P., Roberts, A., Hesketh, L.: Persistent rubella-specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection. J. Med. Virol. 36, 188 - 192, (1992).

Wolinsky, J.: Rubella, in: Virology, 2. Edition, Field, B. N., Kiepe, D. M. et al. (Eds.), Raven Press, Ltd., New York, (1990).