



Rubella Virus

IgG Immunoblot

CE 0483

Immunoblot for the detection of IgG-class antibodies against Rubella Virus in human serum
Immunoblot zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Röteln-Virus (Rubella) in humanem Serum

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2	to	6
Deutsch:	Seite	7	bis	11
Bibliography / Literatur	Page / Seite			14
Symbols Key / Symbolschlüssel	Page / Seite			15
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung	Page / Seite			16

Product Number: RUBG2400 (10 strips)

1. INTRODUCTION

Rubella virus is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus and the only member of the genus rubivirus within the togavirus family. It has a spherical shape measuring about 50-70 nm in diameter. The rubella virion is composed of an inner icosahedral nucleocapsid that is surrounded by a lipid-containing envelope with glycoproteins E1 and E2. Epitopes involved in hemagglutination and neutralization have been identified on E1. In assembled virions E1 forms heterodimers with E2. Rubella virus is of a single antigenic type and does not crossreact with other members of the togavirus group.

Rubella virus causes the children's disease Rubella or 'German Measles' and is spread via respiratory transmission from human to human. The incubation period for rubella is about 14 to 21 days. Rubella virus infects cells of the respiratory tract and spreads via the lymph nodes to the blood. The primary symptom of rubella virus infection is the appearance of a rash (exanthem) on the face which spreads to the trunk and limbs and usually fades after three days. Other symptoms include headache, low-grade fever, lymphadenopathy, upper respiratory symptoms and conjunctivitis. Virus is excreted in nasopharyngeal secretions and in the urine. Persons infected with rubella shed the virus for 7 days before and after the exanthem.

Rubella virus occurs worldwide, and humans are its only known reservoir. In industrial countries natural infection rates in school children are about 50 %. Naturally occurring Rubella is a relatively mild and harmless disease in children and adolescents.

However, if a pregnant woman contracts rubella, the virus can cause serious birth defects or even be fatal to the fetus. The younger the fetus is at the time of infection, the more likely the so-called congenital rubella syndrome (CRS) is to occur and the more severe the effects are likely to be. There appears to be up to a 90 % chance of fetal damage after infection in the first 8 weeks of gestation, this decreases to about 25 % to 35 % for the second trimester. Defects are rare when infection occurs after 16 weeks gestation.

The virus affects the developing organs. Rubella embryopathy (Gregg-Syndrome) is characterized by the classical triad of cardiac defects (patent ductus arteriosus), eye defects (cataracts) and deafness. In addition, a low birth weight, thrombocytopenic purpura, hepatosplenomegaly, encephalitis, hepatitis or mental retardation is possible.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of infection
Rubella Virus	acquired rubella (German Measles)	generalized rash (fever, nausea)	Transmission by close person-to-person contact, spread most probably by droplets via the respiratory tract
	Congenital Rubella Syndrome (Embryopathia rubeolosa)	cardiovascular lesions, eye defects, hearing impairment, CNS involvement and others	fetal infection: transplacental transmission during maternal viremia

Infection may be identified by

- Detection of virus by RT-PCR (prenatal)
- Hemagglutination inhibition (HAI), Haemolysis-in-gel test (HIG)
- Detection of antibodies by EIA, ELISA, immunoblot

Measurement of serum antibodies is important for the determination of the immune status. Even a previous infection though rather overt may not yield a long-lasting immunity, but may result in an antibody titer too low to prevent reinfection. Especially the screening of adolescents and young women should be a mandatory routine in prenatal care.

2. INTENDED USE

The NovaTec Rubella Virus IgG Immunoblot is a qualitative assay for the detection of rubella virus specific IgG antibodies in human serum. In addition it constitutes a useful tool to discriminate between acute and past infections, since the immune reaction to the E2-glycoprotein is delayed. In nonreducing immunoblot E2-specific bands are detectable at the earliest 3 months past infection or vaccination.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Proteins derived from rubella virus were separated electrophoretically according to their molecular weight using nonreducing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Following electrophoresis, the separated protein bands were transferred to a PVDF membrane. The antigen bearing membrane was blocked and cut into ready-to-use strips.

Diluted human sera are incubated with the Antigen Strips. Rubella-specific antibodies, if present, will bind to their target antigens. After washing, anti-human IgG conjugated with horseradish peroxidase is added. At the end of a second incubation, unbound conjugate is removed by washing and aspiration. The bound conjugate is visualized by the addition of a chromogenic substrate. Strips are dried and analysed. Using the kit-specific Template supplied with the kit, the position of the stained bands can be correlated with defined rubella virus antigens.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Rubella Virus Antigen Strips (IgG):** 1 tube containing 10 consecutively numbered western blot strips coated with rubella virus antigens.
- **Template:** 1 predeveloped control strip, kit-specific.
- **IgG Sample Diluent***:** 1 bottle containing 50 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Washing Solution (20x conc.)*:** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer, pH 7.2 ± 0.2 for washing the Antigen Strips; white cap.
- **Rubella Virus anti-IgG Conjugate**:** 1 bottle containing 12 ml of peroxidase labelled anti-human IgG; coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate-Solution Membrane:** 1 bottle containing 12 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; blue cap.
- **Rubella IgG Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 test protocol
- 1 result sheet
- 2 incubation trays

4.3. Materials and Equipment needed

- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Shaking platform
- Micropipettes, 10 and 1000 µl
- Plastic tweezers for handling Antigen Strips
- Vacuum apparatus
- Timer
- Filter paper

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at +2...+8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (+20...+25 °C) before starting the test run!

6.1. Rubella Virus Antigen Strips

The ready to use western blot strips are coated with rubella virus antigens. Store at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C. Do not interchange or mix Antigen Strips from different kits!*

6.2. Rubella Virus anti-IgG Conjugate

The bottle contains 12 ml of a solution with anti-IgG conjugated to horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.3. Control

The bottle labelled with Cut-off Control contains a ready to use control solution. It contains 0.1 % Kathon and has to be stored at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 50 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.5. Washing Solution (20x conc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to +37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.6. TMB Substrate-Solution Membrane

The bottle contains 12 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at +2...+8 °C, away from the light. *The solution should be colourless to pale yellow. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at +2...+8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20...-70 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing! Controls are ready to use and must not be diluted.*

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Perform all assay steps in the correct order and without any appreciable delays between the steps. A clean, disposable tip should be used for dispensing each sample.

1. Using tweezers, carefully remove the number of required Antigen Strips from the tube and place them in the channels of the incubation tray.
2. Transfer 1 ml controls and diluted serum to the appropriate channels of the incubation tray. A new pipette tip must be used with each separate sample. Check that all Antigen Strips are **completely immersed** and, if needed, gently shake the tray or push delicately the strips into the solution with a clean pipette tip. **The numbered side of the strip must face up**; antigens are bound to this side of the membrane.
3. Incubate the strips at room temperature for **60 min** on a shaking platform.
4. Wash procedure
 - Carefully aspirate the contents of each channel, add 1 ml of Washing Solution.
 - Place the incubation tray on the shaking platform for 5 min at room temperature.
 - Aspirate the contents of each channel and repeat the wash procedure two more times.
5. Add **1 ml** of anti-IgG Conjugate to the appropriate channels and incubate at room temperature for **30 min** on the shaking platform.
6. Repeat step 4.
7. Add **1 ml** of chromogenic TMB Substrate-Solution Membrane to the appropriate channels and incubate for **10 min** at room temperature and under observation on the shaking platform.
CAUTION: DO NOT OVERDEVELOP. Some sera show excessive background staining of the strips. To avoid background, stop the reaction earlier by washing with deionised water.
8. Stop the reaction by aspirating the contents of each channel and rinse each strip with **1 ml** of deionised water. Place back the incubation tray on the shaking platform for 5 min. Repeat the 1 ml - 5 min rinse.
9. Remove the strips from the incubation tray and place them with the number face up on filter paper to dry (approximately 30 min at room temperature).

IMPORTANT: to prevent fading, the strips should be protected from exposure to light.

9. RESULTS

9.1. Interpretation of Results

Once dried, attach the strips to the result sheet using clear tape.

- The Rubella Virus IgG Immunoblot utilizes a kit-specific Template consisting of a developed Antigen Strip cut from the membrane used to prepare the Antigen Strips. This strip has been exposed to a positive control serum in order to exhibit bands representative of a rubella virus infection. The corresponding protein bands are listed on the right side of the template.
- Identification of the reactive bands is based upon comparison with the exposed bands on the Template. The horizontal line at the bottom of the strip must be aligned with the index line near the bottom of the control strip.
- For band scoring, determine the reactivity of the following bands:
E1-E1 (116 kDa), E1-E2 (100-105 kDa), C Dimer (66 kDa), E1 (58 kDa), E2 (42-47 kDa)

9.2. Band Specificity

Band	Antigen Characterization
E1-E1 (116 kDa)	E1 envelope glycoprotein; homodimer
E1-E2 (100-105 kDa)	Heterodimer of envelope glycoproteins E1 and E2
C Dimer (66 kDa)	Capsid protein; disulfide linked dimer; associated with the viral RNA
E1 (58 kDa)	Envelope protein; contains several hemagglutinating and neutralizing epitopes
E2 (42-47 kDa)	Envelope protein; exists in two forms, E2a (47 kDa) and E2b (42 kDa), which differ in their glycosylation

Human sera may exhibit other bands than those mentioned above. Such bands should not be considered when interpreting the results.

9.3. Evaluation of Antigen Bands

- The humoral antibody response to rubella virus antigens shows different kinetics: antibodies to structural proteins E1 and C are detectable 2-3 weeks post infection or vaccination. In contrast, reactivity to the E2 protein is considerably delayed.
In nonreducing immunoblot E2-specific antibodies are detectable no earlier than 3 months after infection or vaccination.
If the E2 antigen band is present, an infection within the last 3 months can be ruled out.
- Positive blots are very similar to the control strip on the kit Template.

IMPORTANT: The band intensities are assessed in comparison to the Cut-off Control. Only bands with the same or stronger colour intensities than the corresponding band on the Cut-off Control strip are considered for evaluation.

Antigen bands in Rubella IgG Virus Immunoblot and probable infection status

E1-E1 E1-E2 C Dimer E1	no positive bands	one or more bands positive	one or more bands positive
E2	negative	negative	positive
Probable status of infection	no Rubella virus specific antibodies present fresh infection within the last days can not be excluded	- fresh infection - production of antibodies to E2 delayed or failed	fresh rubella virus infection within the last 3 months can be excluded

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is > 98 %.

10.2. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is > 98 %.

10.3. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 30 mg/ml triglycerides and 1 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. The absence of antibodies reactive with rubella virus antigens on the Rubella Virus IgG Immunoblot cannot exclude a rubella virus infection in all cases. In the early phase of infection, detectable amounts of antibodies may not or not yet be present.

In immunocompromized patients and newborns serological data only have restricted value. Prenatal diagnosis is not possible with Rubella Virus IgG Immunoblot.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents from different production lots or strips from different kits.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after the expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- Always use tweezers to handle Antigen Strips.
- During incubations and washing, the Antigen Strips must remain completely covered with fluid and the numbered side of the strips must face up.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaTec Immunoblot is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes.

12.1. 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.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: RUBG2400 Rubella Virus IgG Immunoblot (10 strips)

1. EINLEITUNG

Das Rubella Virus ist ein umhülltes RNA Virus, das in der Familie der Togaviridae dem Genus Rubivirus zugeordnet wird. Es hat eine sphärische Form und misst etwa 50-70 nm im Durchmesser. Die einzelsträngige RNA positiver Polarität ist von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen, welches von einer Virushülle mit den Glykoproteinen E1 und E2 umgeben wird. Das E1 Protein bildet im reifen Virion Heterodimere mit E2 und ist in dieser Konfiguration Ziel neutralisierender und hämagglutinationshemmender Antikörper. Von Rubella Virus ist nur ein Serotyp bekannt und Kreuzreaktionen mit Alphaviren oder anderen Togaviren wurden nicht gefunden.

Das Virus ist der Verursacher der Rötelninfektion, die besonders bei Kindern und Jugendlichen auftritt. Die Übertragung erfolgt aerogen durch Tröpfcheninfektion. Die Inkubationszeit beträgt 14-21 Tage. Das Virus tritt in den Respirationstrakt ein, befällt die regionalen lymphoiden Gewebe und erreicht schließlich auf hämatogenem Weg die Haut, wo es zur Ausbildung des typischen Exanthems kommt. Der Ausschlag beginnt im Gesicht, breitet sich über Rumpf und Extremitäten aus und klingt gewöhnlich nach drei Tagen ab. Weiter können Kopfschmerzen, erhöhte Temperaturen, Lymphknotenschwellungen, ein leichter Katarrh der oberen Atemwege und eine Konjunktivitis auftreten. Das Virus wird über Sekrete des Nasopharynx und den Urin ausgeschieden. Infektiosität besteht eine Woche vor bis eine Woche nach Auftreten des Exanthems.

Das Rubella Virus ist weltweit verbreitet, einziges Erregerreservoir ist der Mensch. Die natürliche Durchseuchung bei Schulkindern erreicht in den Industrieländern etwa 50 %. Bei Kindern und Jugendlichen verläuft die Krankheit in der Regel relativ harmlos.

Eine über die Plazenta der Mutter erfolgte Infektion des sich entwickelnden Fetus kann dagegen schwere Schäden verursachen, deren Häufigkeit und Schweregrad vom Infektionszeitpunkt während der Schwangerschaft abhängen (beobachtet wurden Schäden in 90 % bei Infektionen in den ersten 8 Schwangerschaftswochen, Schäden in 25 % bis 35 % während des zweiten Trimesters). Eine Rötelnprimärinfektion im 1. bis 4. Schwangerschaftsmonat kann zum Spontanabort, zur Frühgeburt oder zum kongenitalen Röteln Syndrom (CRS) führen. Bei Infektionen nach der 16. Schwangerschaftswoche sind kongenitale Fehlbildungen selten.

Durch das Rubella Virus werden die Organe, die sich gerade in der Entwicklung befinden, geschädigt. Die Röteln-Embryopathie (Gregg-Syndrom) ist gekennzeichnet durch die klassische Trias mit Defekten an Herz (offener Ductus arteriosus), Augen (Katarakt) und Ohren (Innenohrtaubheit). Weitere mögliche Folgen sind ein geringes Geburtsgewicht, thrombozytopenische Purpura, Hepatosplenomegalie, Enzephalitis, Hepatitis oder geistige Retardierung.

Spezies	Erkrankung	Symptome und Komplikationen	Infektionsmodus
Rubella Virus	Röteln	Rötung des Rachenrings, Kopf- und Muskelschmerzen, Fieber, generalisiertes Exanthem, schmerzhafte Lymphknotenschwellung hinter den Ohren und okzipital	Tröpfchen- oder Schmierinfektion
	kongenitales Röteln Syndrom (CRS)	Schwere abhängig vom Schwangerschaftsstand klassisches Bild: Gregg-Syndrom (Taubheit, Katarakt, Fallot-Tetralogie)	Infektion des Fetus: diaplazentar während mütterlicher Virämie

Infektionen können nachgewiesen werden durch

- Virus-Nachweis mittels RT-PCR (pränatal)
- Hämagglutinationshemmtest (HAHT), Hämolysis-in-Gel Test (HIG)
- Antikörpernachweis durch EIA, ELISA, Immunoblot

Die Messung der Antikörpertiter im Serum ist wichtig für die Bestimmung des Immunstatus des Betroffenen.

In seltenen Fällen können vorausgegangene Röteln-Infektionen oder Schutzimpfungen eine lang anhaltende Immunität nicht gewährleisten, da sie in zu niedrigen Antikörpertitern resultieren, um eine Reinfektion zu verhindern. Insbesondere bei jungen Frauen mit Kinderwunsch sollte routinemäßig der Röteln-Immunstatus bestimmt werden.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Rubella Virus IgG Immunoblot ist ein qualitativer Test zum Nachweis Rubella Virus spezifischer IgG-Antikörper in humanem Serum. Darüber hinaus stellt er ein nützliches Hilfsmittel dar, um zwischen akuten und abgelaufenen Infektionen zu differenzieren. Antikörper gegen das E2-Glykoprotein werden im Verlauf der Immunantwort verzögert gebildet und sind im nicht-reduzierenden Immunoblot frühestens 3 Monate nach Infektion oder Vakzinierung nachweisbar.

3. TESTPRINZIP

Proteine aus Rubella Virus wurden elektrophoretisch gemäß ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von nicht-reduzierender Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf eine PVDF-Membran übertragen, unspezifische Bindungsstellen blockiert und die Membran in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Verdünnte Seren werden mit den Antigen-Streifen inkubiert. Sind Rubella Virus-spezifische Antikörper vorhanden, binden diese an ihre auf der Membran fixierten Ziel-Antigene. Nicht-gebundene Serumkomponenten werden durch einen Waschschriff entfernt. In einem

zweiten Reaktionsschritt reagieren Antigen-Antikörper-Komplexe spezifisch mit anti-IgG-Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gekoppelt sind. Am Ende der zweiten Inkubation wird nicht-gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt. Gebundenes Konjugat wird durch die Zugabe eines chromogenen Substrats sichtbar gemacht. Nach dem Trocknen können die gefärbten Antigenbanden anhand der mitgelieferten kitspezifischen Schablone identifiziert werden.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Rubella Virus Antigen-Streifen:** 1 Röhrchen mit 10 fortlaufend nummerierten Western-Blot-Streifen, beschichtet mit Rubella Virus Antigenen.
- **Schablone:** 1 vorentwickelter Kontrollstreifen, kitspezifisch.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 50 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2 ; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Antigen-Streifen, pH 7.2 ± 0.2 ; weiße Verschlusskappe.
- **Rubella Virus anti-IgG-Konjugat**:** 1 Flasche mit 12 ml Peroxidase-konjugiertem Antikörper gegen humanes IgG; rot gefärbt, gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB Substrat-Lösung Membran:** 1 Fläschchen mit 12 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe.
- **Rubella IgG Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronodox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt
- 2 Inkubationswannen

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Vortex-Mischer
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Kippschüttler
- Mikropipetten mit Einmalspitzen, 10 und 1000 μ l
- Plastik-Pinzette
- Absaugsystem mit Desinfektionsfalle
- Timer
- Filterpapier

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei $+2...+8$ °C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur ($+20...+25$ °C) zu bringen!

6.1. Rubella Virus Antigen-Streifen

Die Western-Blot-Streifen sind mit Rubella Virus Antigenen beschichtet. *Die gebrauchsfertigen Streifen sind bei $+2...+8$ °C aufzubewahren. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum. Antigen-Streifen aus verschiedenen Kits nicht austauschen oder mischen!*

6.2. Rubella Virus anti-IgG-Konjugat

Die Flasche enthält 12 ml einer Lösung von anti-IgG-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei $+2...+8$ °C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei $+2...+8$ °C).*

6.3. Kontrolle

Das Kontroll-Fläschchen enthält 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei $+2...+8$ °C aufzubewahren und enthält 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei $+2...+8$ °C).*

6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 50 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf +37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.6. TMB Substrat-Lösung Membran

Das Fläschchen enthält 12 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist farblos bis blassgelb. Sollte die Lösung nach blau umschlagen, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serumproben verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei +2...+8 °C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.*

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10 µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Proben-Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Anzahl benötigter Antigen-Streifen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus dem Röhrchen entnehmen und jeweils in eine separate Rinne der Inkubationswanne geben.
2. 1 ml der Kontrollen bzw. verdünntes Serum in die entsprechende Rinne der Inkubationswanne pipettieren. Für jede Probe muss eine neue Pipettenspitze verwendet werden. Alle Antigen-Streifen müssen **vollständig untergetaucht** sein. Wenn nötig, die Wanne sanft schütteln oder die Streifen mit einer sauberen Pipettenspitze vorsichtig in die Lösung schieben. Die **Nummerierung muss nach oben zeigen**, auf dieser Seite sind auch die Antigene gebunden.
3. Streifen bei Raumtemperatur für **60 min** auf einem Kippschüttler inkubieren.
4. Waschen
 - Flüssigkeit aus jeder Rinne sorgfältig absaugen, 1 ml Waschlösung zugeben.
 - 5 min auf dem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.
 - Flüssigkeit aus jeder Rinne absaugen und Waschvorgang noch zweimal wiederholen.
5. **1 ml** anti-IgG-Konjugat in die entsprechenden Rinnen geben und für **30 min** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
7. **1 ml** der chromogenen TMB Substrat-Lösung Membran zugeben und **10 min** auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und unter Beobachtung inkubieren.

ACHTUNG: NICHT ÜBERENTWICKELN. Bei einigen Seren kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In diesem Fall ist die Farbreaktion vorzeitig durch Spülen mit deionisiertem Wasser zu stoppen.
8. Reaktion durch Absaugen der Flüssigkeit abstoppen und jeden Streifen mit **1 ml** deionisiertem Wasser waschen. Antigen-Streifen 5 min unter Schütteln inkubieren, Wasser absaugen und den Waschschritt wiederholen.
9. Streifen aus der Inkubationswanne nehmen und mit der Nummerierung nach oben auf Filterpapier trocknen (etwa 30 min bei Raumtemperatur).

WICHTIG: die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden, um ein Ausbleichen zu verhindern.

9. ERGEBNISSE

9.1. Interpretation der Ergebnisse

Nach dem Trocknen Streifen mit durchsichtigem Klebeband auf das Ergebnisblatt kleben.

- Rubella Virus IgG Immunoblot enthält eine kitspezifische Schablone mit einem entwickelten Kontrollstreifen. Dieser Streifen stammt aus derselben Membran, die zur Herstellung der Antigen-Streifen verwendet wurde. Er wurde mit einem positiven Kontrollserum inkubiert, um Rubella Virus repräsentative Banden anzuzeigen. Relevante Proteinbanden sind rechts neben dem Streifen aufgeführt.
- Für die Probenauswertung wird der entwickelte Kontrollstreifen auf der Schablone herangezogen. Dazu muss die Index-Linie des Kontrollstreifens an die horizontale Linie am unteren Rand des Teststreifens angelegt werden.
- Zur Bewertung einer Probe wird die Reaktivität für folgende Banden bestimmt:
E1-E1 (116 kDa), E1-E2 (100-105 kDa), C Dimer (66 kDa), E1 (58 kDa), E2 (42-47 kDa)

9.2. Spezifität der Antigenbanden

Bande	Charakterisierung der Antigene
E1-E1 (116 kDa)	E1-Glykoprotein; Homodimer
E1-E2 (100-105 kDa)	Heterodimer aus E1- und E2-Glykoprotein
C Dimer (66 kDa)	Kapsid-Protein; Disulfid-Dimer; assoziiert mit der viralen RNA
E1 (58 kDa)	Hüllprotein; enthält mehrere hämagglutinierende und neutralisierende Epitope
E2 (42-47 kDa)	Hüllprotein; existiert in zwei Formen, E2a (47 kDa) und E2b (42 kDa), die sich in ihrer Glykosylierung unterscheiden

Seren können weitere Banden zu den oben erwähnten aufweisen. Solche Banden sollten nicht in die Testinterpretation einfließen.

9.3. Bewertung der Antigenbanden

- Die Bildung von Antikörpern gegen Rubella-Antigene weist unterschiedliche Kinetiken auf: so erscheinen Antikörper gegen die Strukturproteine E1 und C bereits 2-3 Wochen nach einer Infektion oder Impfung. Im Gegensatz dazu ist die Reaktivität gegen das E2-Protein deutlich verzögert.
Im nicht-reduzierenden Immunoblot können E2-spezifische Antikörper frühestens 3 Monate nach einer Infektion oder Vakzinierung nachgewiesen werden.
Bei Anwesenheit der E2-Bande kann somit eine Infektion innerhalb der letzten drei Monate ausgeschlossen werden.
- Positive Blots ähneln dem Kontrollstreifen auf der mitgelieferten Schablone.

WICHTIG: Die Bandenintensitäten werden im Vergleich zur Cut-off Kontrolle bewertet. Nur solche Banden dürfen in die Bewertung einbezogen werden, deren Farbintensitäten mindestens derjenigen der entsprechenden Bande der Cut-off Kontrolle entsprechen.

Antigenbanden im Rubella Virus IgG Immunoblot und wahrscheinlicher Infektionsstatus

E1-E1 E1-E2 C Dimer E1	keine der Banden positiv	eine oder mehrere Banden positiv	eine oder mehrere Banden positiv
E2	negativ	negativ	positiv
wahrscheinlicher Infektionsstatus	keine Rubella-spezifischen Antikörper vorhanden. frische Infektion innerhalb der letzten Tage kann nicht ausgeschlossen werden.	- frische Infektion - verzögerte oder Ausbleiben der E2-Antikörperbildung	frische Rötelninfektion in den letzten 3 Monaten kann ausgeschlossen werden

10. TESTMERKMALE

10.1. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist > 98 %.

10.2. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist > 98 %.

10.3. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 30 mg/ml Triglyceride und von 1 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden Immunoblot.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Die Abwesenheit von Antikörpern gegen Röteln-Antigene im Rubella Virus IgG Immunoblot kann eine Rötelninfektion nicht in jedem Fall ausschließen. In der Frühphase der Infektion können Antikörper noch nicht oder in nicht detektierbarer Menge vorhanden sein. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert. Eine pränatale Diagnostik ist mit dem Rubella Virus IgG Immunoblot nicht möglich.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen und Antigen-Streifen verschiedener Kits nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Kontrollfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Antigen-Streifen vorsichtig mit einer Pinzette handhaben.
- Während der Inkubations- und Waschschrte müssen die Antigen-Streifen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein und die nummerierte Seite muss nach oben zeigen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaTec Immunoblot ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.






13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: RUBG2400

Rubella Virus IgG Immunoblot (10 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR

- Gregg, N.McA. (1941) Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 3, 35-46
- Waxham, M.N., Wolinsky, J.S. (1983) Immunochemical identification of rubella virus hemagglutinin. *Virology* 126, 194-203
- Zhang, T., Mauracher, C.A., Mitchell, L.A., Tingle, A.J. (1992) Detection of rubella virus-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies by immunoblot assays. *J Clin Microbiology* 30, 824-830
- Wolinsky, J.S. (1996) Rubella. In: *Fields Virology*, 3rd ed., 899-929. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia
- Pustowoit, B., Liebert, U.G. (1998) Predictive value of serological tests in rubella virus infection during pregnancy. *Intervirology* 41, 170-177
- Lee, J.Y., Bowden, D.S. (2000) Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microbiol Rev.*13, 571-587

Symbols Key / Symbolschlüssel	
	Manufactured by / Hergestellt von
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung
	Expiration Date / Verfallsdatum
	Storage Temperature / Lagertemperatur
[REF]	Catalogue Number / Katalog Nummer
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten
STRIP	Antigen-Strips / Antigen-Streifen
TEMP	Template / Schablone
CONJ	Conjugate / Konjugat
CUT OFF	Cut-off Control serum / Cut-off Kontrollserum
DIL G	Sample diluent buffer IgG / IgG-Probenverdünnungspuffer
SUB TMBM	TMB Substrate-Solution Membrane / TMB-Substrat-Lösung Membran
WASH BUF 20x	Washing Solution 20x concentrated / Waschlösung 20x konzentriert
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests

SCHEME OF THE ASSAY

Rubella Virus IgG Immunoblot

Test Preparation

Prepare samples as described.
Note sample and strip numbers as well as lot number and antibody isotype.
Put the required number of antigen strips into the wells of the incubation tray.
Prepare the required volume of Washing Solution.

Assay Procedure

pipette 1 ml Control or diluted sample
↓
incubate for 60 min at room temperature while shaking gently
↓
wash three times for 5 min with 1 ml Washing Solution while shaking
↓
add 1 ml Conjugate
↓
incubate for 30 min at room temperature while shaking gently
↓
wash three times for 5 min with 1 ml Washing Solution while shaking
↓
add 1 ml Substrate-Solution
↓
incubate for 10 min at room temperature while shaking gently
↓
wash two times for 5 min with 1 ml deionised water
dry and read

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
Email: info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

RUBG2400_dt-engl_27052009-EH