



NovaLisa™

Rubella Virus

IgM μ -capture ELISA

CE 0483

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Rubella Virus in human serum
Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Rötelnviren in Humanserum

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative des anticorps IgM dirigés contre Rubella Virus dans le sérum humain

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli anticorpi della classe IgM per Rubella Virus nel siero umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgM contra Rubella virus en suero humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 11
Français:	Page	à
Italiano:	da Pagina	a
Espanol:	Página	a

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	14
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	15
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	16

Product Number: RUBM0400 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

Rubella is an enveloped RNA virus belonging to the togaviruses. It has a spherical shape measuring about 50-70 nm in diameter. There appears to be only one antigenic type, and no cross-reactivity with alphaviruses or other members of the togavirus group has been found. Rubella viruses are pathogens of the respiratory tract and transmitted mainly by droplet infection. Rubella is a worldwide common contagious disease with mild constitutional symptoms and a generalized rash. In childhood, it is an inconsequential illness, but when it occurs during pregnancy, there is a significant risk of severe damage to the fetus. The risk of congenital rubella depends primarily on the month of pregnancy in which infection is acquired: overall, app. 16% of infants have major defects at birth following maternal rubella in the first 3 months of pregnancy. Congenital rubella infection may lead to a syndrome with single or multiple organ involvements, known as embryopathy rubeolosa. In some cases infection is inapparent but results in consequential damages as eye defects, deafness, growth retardation, and others. Naturally acquired immunity usually is long-lasting, but reinfection is possible due to decreasing levels of circulating antibodies. For immunization a vaccine containing live virus is used.

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 (Embryopathy rubeolosa)	Cardiovascular laesions, eye defects, hearing impairment, CNS involvement and others	fetal infection: transmission by hematogenous spread during maternal viremia

Infection may be identified by

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

Measurement of antibodies in the serum 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 IgM μ -capture-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Rubella Virus IgM in human serum.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against Rubella Virus is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique. The Rubella Virus IgM ELISA is an IgM μ -capture ELISA. The plates are coated with anti-human IgM. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase labelled Rubella virus antigen conjugate is added. This conjugate binds to the captured Rubella-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized with Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Rubella-specific IgM antibodies in the specimen. Sulfuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-human IgM-class antibodies; in resealable aluminium foil.
- **Sample Diluent***:** 1 bottle containing 100 ml of ready to use buffer for sample dilution; pH 7.2 \pm 0.2; coloured yellow; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml ready to use sulfuric acid, 0.5 mol/l; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.)*:** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer for washing the wells; pH 7.2 \pm 0.2; white cap.
- **Conjugate**:** 1 vial containing 12 ml conjugate, ready to use, coloured yellow, black cap.
- **TMB Substrate:** 1 vial containing 15 ml 3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine (TMB); ready to use, yellow cap.
- **Rubella Virus IgM Cut-Off Control****:** 1 vial containing 3 ml; coloured yellow; Ready to use; green cap.
- **Rubella Virus IgM Positive Control****:** 1 vial containing 2 ml; coloured yellow; Ready to use; red cap.

- **Rubella Virus IgM Negative Control***:** 1 vial containing 2 ml; coloured yellow; Ready to use; blue cap.
- * contains 0.1 % Bronidox L after dilution
- ** contains Thimerosal
- *** contains 0.1 % Kathon
- **** contains 0.02% Bronidox L and 0.02% Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10, 100 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

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. Coated Snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with anti-human IgM-class antibodies. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Conjugate

The vial contains 12 ml of a horseradish peroxidase conjugate, buffer and stabilizers. The conjugate is ready to use and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Controls

The control vials contain ready to use control solutions with stabilizers and preservatives. It has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. Sample Diluent

The bottle contains 100ml phosphate buffer, stabilizers and preservatives. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20x conc.)

The bottle contains 50ml of a concentrated buffer, detergents, stabilizers and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 5 ml washing solution + 95 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer will keep for at 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 concentrated washing solution is stable until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 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 or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should not be used for the test performance After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date.*

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 (-70 to -20°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*
Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

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

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control

Controls and patient samples should be determined in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into the respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be minimum 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100µl conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C). Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25°C) in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB substrate solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the stop solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to zero using the substrate blank in well A1.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at 450 nm and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

If applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Calculation of Results

The abundance of Rubella IgM is expressed as cut off index (COI) and is calculated as follows (use not more than one decimal to express the abundance):

$$\text{Rubella IgM abundance} = \frac{(\text{mean}) \text{ absorbance of control or patient specimen}}{\text{mean absorbance of cut-off control}} = \text{COI (cut off index)}$$

COI x 10 = NTU (NovaTec Units)

9.2. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met the test run is not valid and has to be repeated.

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **positive** if the abundance is higher than 11 NTU.

Samples with an abundance between 9 and 11 NTU can not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to confirm the results by testing the sample again in duplicate. If results in the second test are again in the grey zone a second serum sample should be tested and judged for a change in result.

Samples are considered **negative** if the abundance is lower than 9 NTU.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Different samples containing different levels of the parameter determined, were assayed to assess repeatability and reproducibility of the assay (Intraassay and Interassay CV%).

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (NTU)</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	3 (48)	28.4	10.3
Pos. Serum	3 (54)	25.3	11.5

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (OD)</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	23	1.3	2.7
Pos. Serum	24	1.1	4.0

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. Diagnostic Specificity was assessed by testing 59 sera specimen from population to be positive and negative for IgM. 51/52 sera were observed negative.

It is 98 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

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

Diagnostic sensitivity was assessed by testing 59 sera specimen from population to be positive and negative for IgM. 8/7 sera were observed positive.

It is 100%

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic or lipemic sera are not observed.

10.5. Cross Reactivity

Cross reactivity with the different serum samples containing antibodies to Parvovirus, Chagas, Trichinella, Helicobacter, Toxoplasmosis, Mumps, EBV, TBE, Dengue virus, Mycoplasma and Bordetella is not observed.

Note: All results (10.2 -10.5) refer to the group of samples investigated, these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. 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.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

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. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- 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 or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after 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.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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.: RUBM0400 Rubella IgM μ -capture ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Das Rötelnvirus ist ein umhülltes Einzelstrang-RNS-Virus, das zur Gruppe der Togaviren gehört. Es hat eine sphärische Form und misst etwa 50-70nm im Durchmesser. Es scheint nur ein Antigen-Typ zu existieren und Kreuzreaktionen mit Alphaviren oder anderen Togaviren wurden nicht gefunden. Das Virus ist der Verursacher der Rötelninfektion, die besonders bei Kindern und Jugendlichen auftritt. Es 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. Die Ausscheidung erfolgt über Sekrete des Nasopharynx und den Urin, die Übertragung vorwiegend aerogen durch Tröpfchen. Infektiosität besteht eine Woche vor bis eine Woche nach Ausbruch der Krankheitssymptome.

Das Rötelnvirus ist weltweit verbreitet, einziges Erregerreservoir ist der Mensch. Die natürliche Durchseuchung bei Schulkindern erreicht in den Industrieländern etwa 50%. Die Krankheit verläuft in der Regel relativ harmlos. Bei Erstinfektion in der Schwangerschaft besteht jedoch – in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsstand (je früher, desto schwerer) – die Gefahr schwerer Embryopathien. Betroffen sind alle Organe, die sich gerade in der Entwicklung befinden. Das klassische Bild der Röteln-Embryopathie (Gregg-Syndrom) ist gekennzeichnet durch Taubheit, Katarakt und Fallot-Tetralogie. Neben Ohr, Auge und Herz können auch andere innere Organe, Zähne, Skelett, Muskulatur und ZNS betroffen sein.

Spezies	Erkrankung	Symptome und Komplikationen	Infektionsmodus	Diagnostik
Rötelnvirus	Röteln	Rötung des Rachenrings, Kopf- und Muskelschmerzen, Fieber, generalisiertes Exanthem, schmerzhafte Lymphknotenschwellung hinter den Ohren und okzipital	Tröpfchen- oder Schmierinfektion	PCR Nachweis von Antikörpern mittels Hämagglutinations-Hemmtest oder ELISA
	Röteln-Embryopathie	Schwere abhängig vom Schwangerschaftsstand klassisches Bild: Gregg-Syndrom (Taubheit, Katarakt, Fallot-Tetralogie)		

Nachweis

- Nachweis der Virus-RNS mittels RT-PCR
- Nachweis mittels Hämolyse im Gel (HiG)
- Nachweis spezifischer Antikörper mittels Hämagglutinations-Hemmtest oder ELISA

Die Messung der Antikörper-Titer im Serum ist wichtig für die Bestimmung des Immunstatus des Betroffenen..

Vorangegangene Röteln-Infektionen oder -Schutzimpfungen können in seltenen Fällen keine lang anhaltende Immunität gewährleisten, da sie in zu niedrigen Antikörper-Titern 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 IgM μ -capture ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Rötelnviren in humanem Serum bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM gegen Rötelnviren beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Der Rötelnvirus IgM ELISA ist ein μ -capture ELISA. Mikrotitertplatten als Festphase sind mit anti-human-IgM Antikörpern beschichtet, um entsprechende Antikörper der Probe zu binden. Überschüssiges Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Nach Zugabe von Meeretich-Peroxidase (HRP) –konjugiertem Rötelnvirus Antigen binden diese an immobilisierte Röteln spezifische IgM-Antikörper. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Anti-human-IgM beschichtete Mikrotiterstreifen:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-human-IgM Antikörpern; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 \pm 0.2; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.5 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20 x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 \pm 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat**:** 1 Fläschchen mit 12 ml Peroxidase konjugiertem Rötelnvirus Antigen, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, schwarze Verschlusskappe

- **TMB-Substrat:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe
- **Rötelnvirus Cut-Off Kontrolle****:** 1 Fläschchen mit 3 ml einer Lösung zur Bestimmung des Cut-Off; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe.
- **Rötelnvirus IgM Positiv-Kontrolle****:** 1 Fläschchen mit 2 ml einer Kontrolllösung; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe.
- **Rötelnvirus IgM Negativ-Kontrolle****:** 1 Fläschchen mit 2 ml einer Kontrolllösung; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe.
- * enthält 0.1% Bronidox L nach Verdünnung
- ** enthält Thimerosal
- *** enthält 0.1% Kathon
- **** enthält 0.02% Bronidox L und 0.02% Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat (37°C)
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit anti-human-IgM Antikörpern beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Konjugat

Das Fläschchen enthält 12 ml Peroxidas Konjugat, Puffer und Stabilisatoren. Das Konjugat ist gebrauchsfertig und bei 2...8°C zu lagern. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2..8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung mit Stabilisatoren und Konservierungsmittel. Sie sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird zur Verdünnung der Patientenproben verwendet. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Waschpuffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird 1:20 mit Aqua dest. verdünnt, z.B. 5 ml Waschpuffer + 95 ml Aqua dest. (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 ist das Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml gebrauchsfertige TMB-Substratlösung und wird bei 2..8°C gelagert.

Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,5 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollte humanes Serum 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). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*
Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefung	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen.

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100µl Kontrollen, Cut Off Kontrolle und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 100µl Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes (z.B.A1) vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 ±1 min bei RT (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substrat Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Die Rötelnvirus IgM Spiegel werden als Cut Off Index (COI) angegeben und berechnen sich wie folgt:

$$\text{Rötelnvirus IgM Spiegel} = \frac{(\text{mittlere}) \text{ Extinktion der Kontrolle bzw. Patientenprobe}}{(\text{mittlere}) \text{ Extinktion der Cut Off Kontrolle}} = \text{COI (Cut Off Index)}$$

COI x 10 = NTU
NTU= NovaTec Einheiten

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn die Rötelnvirus IgM Spiegel über 11 NTU liegen.

Patientenproben mit Rötelnvirus IgM Spiegeln zwischen 9 und 11 NTU können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test zu wiederholen, um das Ergebnis zu bestätigen. Liegen die Rötelnvirus IgM Spiegel erneut in der Grauzone sollte der Test mit einer frischen Patientenprobe wiederholt werden.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn die Rötelnvirus IgM Spiegel unter 9 NTU liegen.

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Verschiedene Proben mit unterschiedlichem Gehalt an Röteln IgM wurden getestet, um die Wiederhol- und Reproduzierbarkeit des Tests beurteilen zu können: Intraassay und Interassay VK (%).

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (NTU)</u>	<u>VK (%)</u>
Pos. Serum	3(48)	28.4	10.3
Pos. Serum	3(54)	25.3	11.5

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>VK (%)</u>
Pos. Serum	23	1.3	2.7
Pos. Serum	24	1.1	4.0

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Die diagnostische Spezifität wurde aus einer Population von 59 positiven und negativen Serumproben bestimmt. 51/52 Seren wurden negativ getestet.

Sie beträgt 98%.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Die diagnostische Sensitivität wurde aus einer Population von 59 positiven und negativen Serumproben bestimmt. 8/7 wurden positiv getestet.

Sie beträgt 100 %.

10.4. Interferenzen

Interferenzen mit hämolytischen und lipemischen Seren wurden nicht beobachtet.

10.5. Kreuzreaktivität

Keine Seren, die Antikörper gegen Parvovirus, Chagas, Trichnella, Helicobacter, Toxoplasmose, Mumps, EBV, FSME, Dengue, Mycoplasma oder Bordetella pertussis enthalten, zeigten mit dem NovaTec Rubella Virus IgM μ -capture ELISA eine Kreuzreaktivität.

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

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. 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. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

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. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- 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 und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen 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 Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

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: RUBM0400 Rubella Virus IgM μ -capture (96 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

- Reef Se., Frey Tk., Theall K., Aabernathy E., Burnett Cl., Icenogl J., McCauley Mm., Wharton M. The changing epidemiology of rubella in the 1990s: on the verge of elimination and new challenges for control and prevention. *JAMA*. 2002 Jan 23-30;287(4):464-72.
- Mezzasoma L Bacarese-Hamilton T., Di Christina M., Rossi R. Bistoni F., Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*. 2002 Jan;48(1):121-30.
- Cooper Lz. Current lessons from 20th century serosurveillance data on rubella. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1287.
- Signore C. Rubella. *Prim. Care Update Ob Gyns*. 2001 Jul;8(4):133-137.
- Weber B. Current developments in the laboratory diagnosis of rubella. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb*. 1997;134(2):31-41.
- Thomas HI, Barrett E, Heskett LM, Wynne A and Morgan-Capner P. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection; *Journal of clinical Virology* 1999, 14: 107 – 118.
- Pinsky NA, Huddelston JM, Jacobson RM, Wollan PC and Poland GA. Effect of multiple freeze-thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies; *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2003, 10(1):19-21.
- Tipples GA, Hamkar, R, Mohktari-Azad T, Gray M, Ball J, Head C and Ratnam S; Evaluation of rubella IgM enzyme immunoassays. *J. Clin. Virol*. 2004, 30:233-238.

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo
	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
	Sample diluent buffer / Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon / soluzione tampone per i campioni / solución tampón para muestras
	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB
	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Rubella Virus IgM μ -capture ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100 μ l	-	-	-
Positive control	-	-	100 μ l	-	-
Cut-off control	-	-	-	100 μ l	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300 μ l of washing solution					
Conjugate	-	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300 μ l of washing solution					
TMB Substrate	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email : info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

RUBM0400engl;dt25032009-AD