



ENZYWELL

RUBELLA IgG AVIDITY

REF 91095 (24 tests)

Manufactured by: DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy

CE
0123

INDICE / INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / CONTENU DU COFFRET ET PREPARATOIN DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / MODALITE DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TYPE D'ECHANTLLON
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / MODE OPERATOIRE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / VALIDATION OF THE TEST / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DES RESULTATS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITES DE LA METHODE
13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE
14. PRECISIONE / PRECISION
15. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING"
16. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY KIT**

REF 91095

1. UTILIZZAZIONE:

METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'AVIDITA' DEGLI ANTICORPI IgG ANTI VIRUS DELLA ROSOLIA NEL SIERO UMANO .

2. INTRODUZIONE:

Il virus della Rosolia provoca nell'uomo una malattia contagiosa molto comune caratterizzata da esantema diffuso. Il decorso è generalmente breve e privo di complicazioni.

Se la malattia è invece contratta durante la gravidanza ci sono conseguenze per il feto in quanto il virus è teratogeno e provoca gravi malformazioni specialmente durante il primo mese di gestazione.

Per questo motivo è essenziale conoscere lo stato immunitario della paziente prima dell'inizio della gravidanza in quanto si può procedere alla vaccinazione o, se questa è impossibile, al frequente monitoraggio per osservare l'eventuale sierconversione.

Alcune volte non basta la sola individuazione di anticorpi IgM, poiché la presenza di questi anticorpi può essere dovuta a persistenza delle IgM o reinfezione asintomatica da Rosolia, senza presentare rischi per il feto.

Per questo risulta utile dosare l'avidità degli anticorpi IgG in quanto è stato dimostrato che questa è bassa nella fase acuta ed aumenta con il passare del tempo.

Per questo la presenza di anticorpi a bassa avidità è indice di infezione recente o in atto.

L'avidità delle IgG nel siero può essere dosata con questo kit ELISA.

3. PRINCIPIO DEL METODO:

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigene da Virus della Rosolia purificato ed inattivato viene legato alla fase solida. Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. Il campione viene deposto in due pozzetti (o in quattro per il test in duplicato) e lasciato in incubazione. Dopo lavaggio della fase solida, in un pozzetto viene posto il Tampone Avidity mentre nell'altro soluzione di lavaggio. Il primo tampone provocherà la dissociazione del legame tra antigene ed anticorpo e questa sarà proporzionale alla avidità degli anticorpi. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con l'enzima Perossidasi di rafano.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato specifico per l'enzima.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame rimasti legati all'antigene legato alla fase solida. Il rapporto tra la densità ottica del pozzetto dove è stato incubato il tampone Avidity e quella dove è stato incubato il tampone di lavaggio è espresso in percentuale e costituisce la misura dell'avidità del siero in esame verso il virus della Rosolia.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 24 determinazioni.

- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE *MICROPIASTRA SENSIBILIZZATA CON VIRUS DELLA ROSOLIA (COLORATE IN ROSSO). 3 x 16 pozzetti.*

Uso: Aprire l'involucro delle strips dalla parte opposta al codice (R seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto ed inserire i pozzetti necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONJ *CONJUGATE. 1 x 12 mL.*

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi, in tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL CONTROLLO DI AVIDITÀ (2,5 mL)

Contenuto: Siero umano contenente IgG anti Rubella in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

AVIDITY BUF TAMPONE AVIDITY (1 x 10 mL)

Contenuto: Urea in soluzione salina tamponata contenente fenolo (0.05%) e Bronidox (0.02%), pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima dell'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X. 1 x 100 mL. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte, contenente Brij 0.5% p/v.

Preparazione: Diluire 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 50x DILUENT 50X. 1 x 4.5 mL. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica concentrata 50x, contenente BSA 5% p/v e Bronidox 0.02%.

Preparazione: Diluire 1:50 nel tampone di lavaggio per avere il diluente pronto all'uso.

SUBS TMB SUBSTRATE. 12 mL. Pronto all'uso. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina ed H₂O₂ stabilizzati in tampone citrato pH 3,8.

Stabilità: Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato a 2/8°C.

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION. 1 x 16 mL. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0.3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
SIERI DI CONTROLLO	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C; 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	p.uso 2 settimane 2/8°C
WASH BUFFER	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
AVIDITY BUFFER	fino alla scadenza a 2/8°C
STOP SOLUTION	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) Il controllo contiene come conservante sodio azide 0.09% che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi. Per la sua eliminazione diluire con molta acqua.
Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'utilizzo del kit su strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:

- installazione e requisiti particolari
- principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
- specifiche del produttore e performance dello strumento
- manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. Se non è possibile il prelievo di un campione fresco, i campioni dovrebbero essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione (3000 rpm x 10').

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparare il diluente dei campioni aggiungendo il DILUENT 50x al tampone di lavaggio (4 mL + 200 mL).

Lasciare un pozzetto vuoto per il bianco. Diluire i campioni 1:301 dispensando 5 µL di siero in 1,5 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito in almeno due pozzetti, e 100 µL di Siero di Controllo in duplicato. Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 60' a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30" ciascuno (300 µL), dispensare in un pozzetto sia dei campioni che dei controlli il Wash Buffer e nell'altro il Tampone Avidity e incubare per 10' a 37°C. Aspirare il tampone ed eseguire 4 lavaggi della durata di 30". Si aggiungono 100 µL di coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare 45' a 37°C, coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato 100 µL/pozzetto., compreso il bianco. Dopo 15' a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la DO a 450 nm o a 450/620 nm entro 30'.

9. Schema del protocollo di prova per RUBELLA IgG AVIDITY KIT
--

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Mettere 100 µL di siero diluito/ controllo in doppio nei pozzetti dello strip.
-
Incubare 60 min. a 37°C
-
Lavare 4 volte (300 µL)
- |
| STEP 2 | Per ciascun campione/controllo distribuire in un pozzetto mettere 100 µL di Wash Buffer e in un pozzetto 100 µL di Tampone Avidity, incubare 10' a 37°C.
-
Lavare 4 volte (300 µL)
- |
| STEP 3 | Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto
-
Incubare 45 min. a 37°C
-
Lavare 4 volte
- |
| STEP 4 | Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto compreso il bianco
-
Incubare 15 min. a t.a.
- |
| STEP 5 | Aggiungere 100 µL di Stop Solution
-
Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min. |

10. VALIDAZIONE DEL TEST

La OD Bianco deve essere $\leq 0,15$.

Il controllo nei pozzetti incubati con il Wash Buffer deve riportare un valore di OD > 0.500 .

La percentuale di avidità del controllo deve essere maggiore del 45%, calcolata come riportato nel paragrafo "Calcolo e Interpretazione del Test".

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

La percentuale di avidità dei campioni è espressa e calcolata facendo il rapporto tra le densità ottiche trovate nel pozzetto con Tampone Avidity e quello con Wash Buffer sottratte entrambi del valore del bianco.

D.O. con Tampone Avidity – D.O. bianco

$$\frac{\quad}{\quad} \times 100 = \% \text{ di avidità}$$

D.O. con Wash Buffer – D.O. bianco

Quando questo rapporto è maggiore del 45%, indica la presenza di IgG anti-Rosolia ad alta avidità, quando è minore del 35% indica la presenza di IgG anti-Rosolia a bassa avidità. Quando la percentuale è compresa tra 35 e 45% siamo di fronte a IgG anti-Rosolia a media avidità (Borderline).

Il calcolo può essere effettuato solo su campioni che hanno una DO del pozzetto lavato con Wash Buffer ≥ 0.40 .

Avvertenza: Per D.O. < 0.4 ripetere il test diluendo il campione 1/101.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Un risultato di alta avidità non esclude la possibilità che vi sia stata una infezione recente.

13 SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati testati 115 campioni con il kit Diesse ed in parallelo con uno della concorrenza ; in tutti i campioni erano stati determinati gli anticorpi specifici IgG e IgM.

I campioni erano suddivisi nei seguenti gruppi:

- 54 appartenevano a soggetti con storia di recente infezione di Rubella.(44 positivi in IgM, 4 dubbi e 6 negativi).
- 41 campioni di donne gravide
- 20 campioni di donne in età fertile positive alle IgG e negative alle IgM.

Il kit Diesse identifica 104 casi su 115 con una correlazione del 90% quando comparato all'altro metodo.

14. PRECISIONE

Tab.1 Precisione nella prova (n=6)

Campione	%media avidità	D.S.	CV%
Bassa Avidità	14	1	8
Alta Avidità	91	4	4

Tab.2 Precisione tra prove

Campione	%media avidità	D.S.	CV%
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	35

15 GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).

		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
2. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
3. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy.
Tel. 0577-587111



INSTRUCTIONS FOR USE

**ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY KIT**

REF 91095

(English)

1. INTENDED USE:

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE AVIDITY OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO RUBELLA IN HUMAN SERUM

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST:

Rubella virus causes a very common infectious disease in humans, accompanied by a typical diffused rash. The course of the illness is generally short and without complications. However, it is harmful for the fetus if contracted during pregnancy, because the virus is teratogenic and may cause very serious malformations especially during the first month of pregnancy. It is therefore essential to determine the patient's state of immunity before the start of pregnancy, if possible, in order to perform vaccination or, if this is impossible, to monitor the course of the pregnancy to observe whether seroconversion occurs.

Sometimes it is not sufficient to test for IgM antibodies, as the presence of this class may be due to the persistence of IgM or asymptomatic reinfection by Rubella, without risk for the fetus.

For this reason it is useful to assay the avidity of the IgG antibodies, in as far as it has been demonstrated that avidity is low in the acute phase of infection and increases over a period of time. The presence of low avidity antibodies is therefore an indication of a recent or current infection. The avidity of IgG antibodies in the serum can be assayed with this ELISA kit.

3. PRINCIPLE OF THE TEST:

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

The purified and inactivated Rubella virus antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum. The sample is placed in two wells (or in four wells if the test is performed in duplicate) and left to incubate.

After washing of the solid phase, the Avidity Buffer is placed in one well and the rinsing buffer in the other. The avidity buffer will cause dissociation of the antigen/antibody bond, proportional to the avidity of the antibodies. After washings to eliminate the proteins that have not reacted, incubation is performed with the conjugate composed of anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase HRP.

The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate specific for the enzyme is added.

The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample still bound to the antigen. The ratio between the OD of the well containing the Avidity buffer and that containing the Wash Buffer is expressed as a percentage and gives the degree of avidity of the serum sample for the Rubella antigen.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION:

- Reagents are sufficient for 24 determinations.
- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE COATED WITH RUBELLA VIRUS (COLOURED IN RED). 3 x 16 wells.

Use: open the package at the opposite end from the code (R followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and wells to be used from the foil package, and place the unused wells in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONJ CONJUGATE. 1x12 mL.

Contents: anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL AVIDITY CONTROL (2.5 mL)

Contents: Human serum containing anti-Rubella IgG antibodies diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

AVIDITY BUF AVIDITY BUFFER (1 x 10 mL)

Contents: Urea in saline buffered solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before use.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X. 1 x 100 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% w/v.

Preparation: dilute 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 50x DILUENT 50X. 1 x 4.5 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

For dilution of serum samples.

Contents: Proteic solution conc. 50 times, containing BSA 5% w/v and Bronidox 0.02%.

Preparation: Dilute 1:50 in the washing buffer to obtain the diluent ready for use.

SUBS TMB SUBSTRATE. 12 mL. Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide stabilised in citrate buffer, pH 3.8.

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION. 1x16 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 0.3 M, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Microplate reader, wavelength 450 nm or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control serum	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	ready for use, 2 weeks at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Avidity Buffer	up to the expiry date at 2/8°C
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The Control contains Sodium Azide 0.09% as preservative which may react with copper and lead in plumbing to form potentially explosive metal azides. On disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. The use of the kit with automated instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
 - servicing and maintenance.
 -

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C; avoid repeated freeze/thaw cycles. Defrosted samples must be carefully shaken before performing the test.

O.D. with Avidity Buffer – O.D. blank
 _____ x 100 = % of avidity

O.D. with Wash Buffer – O.D. blank

A ratio over 45% indicates the presence of high avidity IgG antibodies; when it is lower than 35%, this indicates the presence of low avidity IgG. If the percentage is between 35 and 45%, there is a medium degree of avidity (borderline). The calculation can only be performed on samples which give an OD \geq 0.40 in the well washed with Wash Buffer.

WARNING: If the O.D. $<$ 0.4, repeat the test diluting the sample 1/101.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A result of high avidity does not exclude the possibility of a recent infection.

13. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

115 samples were tested with the Diesse kit and in parallel with another commercial test; all the samples had been studied for the presence of specific IgG and IgM.

The samples were divided into the following groups:

- 1) 54 from subjects with a recent history of Rubella infection (44 positive in IgM, 4 doubtful and 6 negative).
- 2) 41 samples from pregnant women.
- 3) 20 samples from fertile women, positive for IgG and negative for IgM.

The Diesse kit identified 104 cases out of 115 with a correlation of 90% in comparison to the other method.

14. PRECISION

Table 1 Precision in run (n=6)

Sample	% average avidity	D.S.	CV%
Low avidity	14	1	8
High avidity	91	4	4

Tab.2 Precision between runs

Sample	% average avidity	D.S.	CV%
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	35

14. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or	Check for temperature control and time

	temperature	monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
2. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
3. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy.
Tel. 0577-58711