

MASTAFLUOR™ MUMPS

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-/ IgM-Antikörpern gegen das Mumps-Virus in humanem Serum und Plasma

Immunofluorescence assay for the detection of IgG / IgM antibodies to Mumps Virus in human serum and plasma

Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only



Deutsch: Seiten 02–04



English: Pages 05–07

MASTAFLUOR™ MUMPS IgG	REF 636324	10 x 5 Tests
MASTAFLUOR™ MUMPS IgG	REF 636326	10 x 10 Tests
MASTAFLUOR™ MUMPS IgM	REF 636325	10 x 5 Tests
MASTAFLUOR™ MUMPS IgM	REF 636327	10 x 10 Tests

Hersteller / Manufactured by:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriumspräparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
Web: www.mast-diagnostica.de
E-Mail: mast@mast-diagnostica.de

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
MAST House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
Web: www.mastgrp.com
Email: sales@mastgrp.com

Distribué per:

MAST Diagnostic
115, Rue Jules Barni
F-80000 Amiens
France France
Phone: + 33 3 22808067
Fax: + 33 3 22809922
Web: www.mastgrp.com
Email: service-commercial@mast-diagnostic.fr

Einführung

Mumps ist im Kindesalter eine vorwiegend mild verlaufende Allgemeinerkrankung, die jedoch mit zunehmendem Alter der Patienten schwerere Verläufe zeigt. Die Krankheit entsteht durch eine Infektion mit dem Mumpsvirus, das zu der Familie Paramyxoviridae gehört. Normalerweise werden Kinder im Alter zwischen 4 und 10 Jahren infiziert. Das Virus breitet sich über Tröpfcheninfektion oder direktem Kontakt mit dem Speichel des Patienten aus. Saisonal tritt das Virus am häufigsten im Winter und Frühjahr auf. Nach durchlaufener Infektion oder durch eine Impfung wird eine andauernde Immunität erreicht.

Neben der Parotitis als Leitsymptom sind häufig auch andere Organe von der Krankheit betroffen, wie das ZNS und das lymphatische Gewebe. Die Mumps-Meningitis ist eine häufige Manifestation der Erkrankung. Sie tritt nicht selten ohne Parotitis auf. Die Angaben über die Häufigkeit schwanken zwischen 1,4 % und 66 % der klinisch Erkrankten. In den meisten Fällen heilt sie komplikationslos aus.

Die labordiagnostische Bestätigung von Mumps wird durch den Erregernachweis oder durch die Bestimmung erregerspezifischer Antikörper geführt. Die Serodiagnostik spielt hierbei die größere Rolle. Neben den klassischen Methoden wie KBR, HAH und NT stehen der Immunfluoreszenztest, der Hämolyse-in-Gel-Test, der Radioimmunoassay sowie der Enzymimmunoassay zur Verfügung.

Eine IgG-Immunität kann über den IgG-Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden. Da eine Kreuzreaktion mit dem Parainfluenza-Virus (Typ 2) zu falschen Ergebnissen führen kann, sind steigende IgG-Titer hilfreich bei der Feststellung des auslösenden Agens. Zu Beginn der Erkrankung liegen in der Regel hohe IgM-Titer vor.

Verwendungszweck

Der MASTAFLUOR™ MUMPS ist ein Immunfluoreszenztest zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Mumps-Virus.

Testprinzip

Das verdünnte Probenmaterial (Serum, Plasma) wird zusammen mit den erforderlichen Kontrollen auf die Testfelder des Objektträgers pipettiert. Die Testfelder sind mit BMK-Zellen beschichtet, die mit dem Mumps-Virus infiziert wurden. Sofern spezifische Antikörper im Probenmaterial sind, binden diese an entsprechende Antigenstrukturen auf den Testfeldern und bilden mit diesen einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex. Unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. An die spezifischen Komplexe binden dann in einer Konjugatreaktion FITC-gekoppelte Anti-human-IgG- bzw. FITC-gekoppelte Anti-human-IgM-Antikörper. Anschließend werden unspezifisch oder nicht gebundene Reaktionskomponenten durch einen Waschschrift entfernt. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Testfelder ausgewertet. Liegen Antikörper gegen Mumps im Serum vor, fluoreszieren spezifische cytoplasmatische Einschlüsse in den infizierten Zellen.

Packungsinhalt

Inhalt	100 Tests	50 Tests	Spezifikation
Objektträger	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Beschichtet mit Mumps-Virus infizierten BMK-Zellen
Positives Kontrollserum	0,5 mL	0,5 mL	IgG- oder IgM-positives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
Negatives Kontrollserum	0,5 mL	0,5 mL	IgG- und IgM-negatives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
FITC-Konjugat	3 mL	2 mL	FITC-markiertes Anti-human-IgG (γ-Kette) oder FITC-markiertes Anti-human-IgM (μ-Kette); gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
Evans Blue	3 mL	3 mL	gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
Eindeckmedium	3 mL	3 mL	gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃
PBS	2 Sachets	2 Sachets	Je 1 Sachet in 1 L destilliertem Wasser lösen, pH 7,2 ± 0,2

Zusätzlich benötigte Materialien

Sterile Reaktionsgefäße

Mikropipetten und dazu passende Spitzen

Küvetten

Feuchte Kammer

Messkolben oder Messbecher

Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

Pinzette

Deckgläser

(Wasch-) Pufferflasche

Fluoreszenzmikroskop mit einem 490 nm Anregungsfilter (Blauanregung) und 510 nm Sperrfilter und Farbteiler.

Haltbarkeit und Lagerung

Der MASTAFLUOR™ MUMPS ist bis zu dem auf dem Etikett vermerkten Haltbarkeitsdatum verwendbar, sofern er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Der PBS-Puffer ist nach dem Auflösen 30 Tage stabil, wenn er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Serum- und Plasmaproben können 48 Stunden bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten sie bei -20 °C eingefroren werden. Allerdings sollten wiederholte Einfrier-/ Auftauzyklen vermieden werden.

Warnhinweise

1. Der Kit dient nur zur *in-vitro* Diagnostik.
2. Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsinformation lesen. Die Testdurchführung nicht ohne Validierung modifizieren.
3. Keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum verwenden.
4. Die allgemeinen Arbeitsschutzrichtlinien für das Arbeiten mit potentiell infektiösen Materialien einhalten. Es wird empfohlen, entsprechende Schutzkleidung zu tragen. Den Test immer in geeigneten Laborräumen abarbeiten.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Wenn möglich, sollten Einmalpipettenspitzen und Einmalreaktionsgefäße verwendet werden. Es dürfen nur gereinigte Laborgläser verwendet werden, die nach dem Spülen mit demineralisiertem oder destilliertem Wasser abgespült wurden.
7. Die im Kit enthaltenen Kontrollen sind Humansenen, die auf Antikörper gegen das HI-Virus und HBsAg getestet wurden und für negativ befundet wurden. Dennoch sollten alle menschlichen Seren als potentiell infektiös angesehen werden, weil Infektionen nicht mit letztendlicher Sicherheit ausgeschlossen werden können.
8. Nur Wasser von hoher Qualität verwenden (destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität).
9. Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen mischen.
10. Eine Kontamination der Reagenzien vermeiden; die Flaschen immer wieder mit den richtigen Deckeln verschließen. Zum Pipettieren immer eine neue Pipettenspitze für jeden Arbeitsschritt verwenden.
11. Ein Austrocknen der Wells verhindern.
12. Die Objektträger nicht direktem Sonnenlicht oder anderen vergleichbar extremen Bedingungen aussetzen.
13. Probenmaterialien und Einmalartikel, die mit dem Probenmaterial in Kontakt gekommen sind, entsprechend gängiger Vorschriften zur Entsorgung potentiell infektiösen Materials vernichten. Arbeitsflächen mit einem geeigneten Flächendesinfektionsmittel gemäß der Anwendungsvorschrift dekontaminieren. Glasgefäße o. ä. können bei 121 °C autoklaviert werden.
14. FITC-Konjugate sollen nicht dem Sonnen-, UV- oder Fluoreszenzlicht ausgesetzt werden. Sofern die Konjugate nicht benötigt werden, diese lichtgeschützt aufbewahren.
15. Seren, die erkenntlich mikrobiologisch kontaminiert sind, nicht verwenden.
16. Hämolytische oder lipämische Seren können bei 56 °C inaktiviert werden.
17. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid oder Proclin als Konservierungsmittel. Beide Reagenzien reagieren bei Inkorporation toxisch. Natriumazid kann mit Metallen (Blei, Kupfer), explosive Metallazidverbindungen bilden. Bei der Entsorgung von Azidreagenzien über den Laborabfluss ist daher mit viel Wasser nachspülen.

Testdurchführung

1. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
2. 1 Sacht des PBS-Puffers mit 1 L destilliertem Wasser oder Wasser höherer Qualität lösen.
3. Für den IgG- und IgM-Ansatz die Patientenseren 1:20 mit PBS verdünnen.
Beispiel: 10 µL Serum + 190 µL PBS

Für die IgM-Bestimmung wird eine Präabsorption mit MASTSORB (Kat.-Nr.: 651003) empfohlen, um z.B. eine Störung durch Rheumafaktoren zu minimieren.
Kontrollen dürfen nicht absorbiert werden.
4. Die Kit-Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden.
5. Den eingeschweißten Objektträger an der Einkerbung aufreißen und vorsichtig aus der Alutüte herausnehmen.
6. Je 20–25 µL der Kontrollen oder der verdünnten Patientenproben auf ein Testfeld pipettieren. Die Probe soll das ganze Testfeld bedecken. Mit der Pipettenspitze dabei nicht über das Testfeld kratzen.
7. Die Objektträger in eine feuchte Kammer legen.
IgG-Ansätze 30 min / IgM-Ansätze 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Nach der Inkubation die Objektträger vorsichtig aus der feuchten Kammer nehmen und mit PBS aus einer Spritzflasche vorsichtig auf die Mitte des Objektträgers zielen, um die Seren von den Testfeldern abzuspülen. Dabei nie direkt mit dem Spritzstrahl auf die Testfelder zielen.
9. Die Objektträger in einer Küvette mit PBS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur waschen. Ein Wechseln des Puffers nach 5 min erhöht die Waschstringenz.
10. Die Objektträger aus dem Puffer nehmen und den Puffer kurz von der Maske abklopfen, indem man mit der Längsseite des Objektträgers auf eine saugfähige Unterlage klopft. Nie mit einem Papiertuch o. ä. über die Testfelder wischen!
11. Die Objektträger sofort in die feuchte Kammer legen und einen Tropfen des entsprechenden FITC-Konjugats (20–25 µL) auf jedes Testfeld tropfen. Das Konjugat soll das ganze Testfeld bedecken. Die Testfelder dürfen nach dem Waschschrift zu keinem Zeitpunkt eintrocknen!
12. Die Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur inkubieren (gilt für IgG- und IgM-Ansätze).
13. Es empfiehlt sich, das Mikroskop etwa 10–15 min vor Ablauf der Konjugatinkubation anzuschalten, damit die Lampe einbrennen kann. Bitte stets die Betriebsanleitung des Mikroskops beachten.
14. Nach der Konjugatinkubation die Objektträger wie unter den Pkt. 9 und 10 beschrieben waschen.

- Optional können dem letzten Waschschrift 3-5 Tropfen Evans Blue zur Gegenfärbung zugegeben werden. Mit der Gegenfärbung erreicht man eine stärkere Kontrastierung des Präparates.

Nach der Evans Blue Färbung die Objektträger kurz in eine Küvette mit frischem PBS tauchen, um Reste des Evans Blue abzuspielen.

- Einen kleinen Tropfen Eindeckmedium auf jedes Testfeld tropfen und mit einem Deckglas den Objektträger eindecken.

Hinweis: Wird zuviel Eindeckmedium auf die Testfelder getropft, so kann das Deckglas beim Mikroskopieren leicht verrutschen. Zudem kann überschüssiges Eindeckmedium zu einer Lichtstreuung führen, was eine hohe Hintergrundfluoreszenz zur Folge hat. Überschüssiges Eindeckmedium kann mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden, indem man dieses an die Längsseite des Objektträgers hält.

- Die Reaktionen können nun mit einem Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es empfiehlt sich dabei eine 400- bis 800-fache Vergrößerung.

Interpretation der Reaktionen

Validierung des Tests

Die Kontrollen müssen folgende Reaktionen zeigen:

Probe	Fluoreszenzintensität
Positive Kontrolle IgG	3 + bis 4 +
Positive Kontrolle IgM	1 + bis 3 +
Negative Kontrolle	negativ

Zur korrekten Beurteilung der Patientenproben sollten immer die positive und negative Kontrolle mit herangezogen werden.

Interpretation der Patientenreaktionen

IgG-positive Proben zeigen eine grüne Fluoreszenz von mehreren grob- bis feinkörnigen Einschlüssen NUR im Cytoplasma der infizierten Zellen. Etwaige Kernfluoreszenzen gelten nicht als positiv.

IgG-negative Proben zeigen keine oder nur eine mattgrüne Fluoreszenz.

IgM-positive Proben zeigen eine grüne Fluoreszenz von mehreren grob- bis feinkörnigen Einschlüssen im Cytoplasma der infizierten und nicht-infizierten Zellen ist möglich. Die Fluoreszenzstärke ist abhängig von der Antikörperkonzentration.

IgM-negative Proben zeigen keine Fluoreszenz.

Proben, die in der Verdünnung des Suchtiters zu grenzwertigen Ergebnissen führen, sollten mit einer neuen Probe erneut getestet werden.

Eine Verlaufskontrolle liefert zudem Hinweise, die auf eine unspezifische Reaktion schließen lassen können.

Grenzen des Nachweisverfahrens / Kreuzreaktionen

- Aufgrund der Antigenverwandschaft von Mumps- und Parainfluenzaviren, insbesondere dem Parainfluenzavirus Typ 2, kann es zwischen beiden Erregern zu Kreuzreaktionen kommen. Bei positiven und grenzwertigen Ergebnissen ist es daher ratsam, durch geeignete Test-/ Untersuchungsverfahren, eine Infektion mit o. g. Erregern auszuschließen.
- Der MASTAFLUOR™ MUMPS ist hoch-sensitiv und hoch-spezifisch. Dennoch sollte auch dieser Test wie auch jeder andere Labortest nicht allein zur Festlegung der Diagnose verwendet werden, sondern immer in Verbindung mit anderen Testverfahren, der Anamnese und dem klinischen Bild des Patienten.

Leistungsdaten

Die Tabellenangaben beziehen sich auf Testergebnisse, die mit Vergleichsmethoden ermittelt wurden:

	IgG	IgM
Sensitivität	94,6 %	50 %
Spezifität	86,2 %	98,9 %

Die Inter- und Intra-Assay Varianz zeigt bei diesem Test keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Kontrollen.

Literatur

- Bayas JM; Vilella A; Vidal J; Nebot X; Carbo JM; Navarro G. Prat A; Asenjo MA; Salleras L: Susceptibility to measles, rubella and parotitis in young adults. Med Clin (Barc), 106 (15): 561–4 (1996).
- Gut JP; Lablache C; Behr S; Kirn A. Symptomatic mumps virus reinfections. J Med Virol, 45 (1): 17–23 (1995).
- Johnson CE; Kumar ML; Whitwell JK; Staehle BO; Rome LP; Dinakar C; Hurni W; Nalin DR. Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. Pediatr Infect Dis J, 15 (8): 687–92 (1996).
- King SM; Saunders EF; Petric M; Gold R. Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. Bone Marrow transplant, 17 (4): 633–6 (1996)
- Matter L; Germann D; Bally F; Schopfer K. Age-stratified seroprevalence of measles, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. Eur J Epidemiol, 13 (1): 61–66, (1997)

Introduction

Mumps (Parotitis) is a common contagious disease with relatively moderate symptoms during childhood, but increasing complications, when adults are infected. The causative agent of mumps is a virus of the Paramyxoviridae family. The virus normally infects children at the age of 4 to 10. The infection is mainly transmitted by the airborne route, but is also spread by various objects contaminated by the patient saliva. The disease shows a seasonal prevalence with the greatest incidence in winter and spring. Both a mumps infection and vaccination lead to a persistent immunity.

The typical symptom associated with a mumps infection is a "parotitis" (swelling of the parotid glands). Additionally pathological involvement of the CNS and various glandular organs (pancreas, thymus, thyroids) is a typical feature of mumps. Mumps induced meningitis is one of the most frequent manifestations of the disease which can also appear without parotitis. The published data about the presence of meningitis vary between 1.4 % and 66 % of the clinically ill patients. In most cases convalescence follows without complications.

The recognition of Mumps in the laboratory is mostly done by detection of the infectious agent itself or by the determination of virus-specific antibodies. The serodiagnosis plays a major part. Besides the classical methods like complement fixation, haemagglutination and neutralisation tests have been introduced a series of modern assays like immunofluorescence, radio immunoassay and enzyme immunoassay. Increasing IgG titers are helpful in the determination of the causative agent because cross reactions with Parainfluenza-Virus type 2 may lead to a wrong interpretation of the patient reports. In the early stage of the disease, significant IgM titers may be monitored.

Intended Use

MASTAFLUOR™ MUMPS provide an indirect immunofluorescence test system for the detection of specific antibodies to Mumps virus antigen.

Test Principle

IFA slides are coated with BMK cells infected with Mumps virus. Diluted patient serum or plasma is incubated on the wells of the slide. In the presence of specific antibodies a stable antigen-antibody complex is formed. Unspecific or un-bound antibodies are removed in a washing step. Specific immune complexes are then detected by either a FITC-conjugated anti human IgG or IgM antibody. Again unspecific or non-bound antibodies are removed in a washing step. Results could be read visually using an immunofluorescence microscope. Positive reactions show specific cytoplasmic inclusions in infected cells.

Kit Contents

Content	100 Tests	50 Tests	Specifications
Slides	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Coated with Mumps virus infected BMK cells
Positive control	0.5 mL	0.5 mL	IgG or IgM positive serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
Negative control	0.5 mL	0.5 mL	IgG and IgM negative serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
FITC-conjugate	3 mL	2 mL	Anti-human-IgG (γ-chain) FITC-conjugate or Anti-human-IgM (μ-chain) FITC-conjugate; ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
Evans Blue	3 mL	3 mL	ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
Mounting medium	3 mL	3 mL	ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃
PBS	2 Sachets	2 Sachets	1 sachet to be diluted in 1 L of distilled water, pH 7.2 ± 0.2

Materials Required but not Provided

1. Sterile test tubes
2. Micropipettes and tips
3. Staining dish or Coplin jar
4. Moist chamber
5. Volumetric flask for PBS
6. Distilled water or water of higher quality
7. Forceps
8. Transmitted or epi-fluorescent microscope with a 490 nm excitation filter and a 510 nm barrier filter
9. Cover slips
10. Wash bottle

Stability and Storage

MASTAFLUOR™ MUMPS is stable until end of shelf life as indicated on kit label. The kit should be stored at 2–8 °C.

Reconstituted PBS powder should be stored at 2–8 °C for up to 30 days.

Serum and plasma specimens may be stored at 2–8 °C for up to 48 hours prior to use or for longer storage at -20 °C. Repeated freezing and thawing of specimens should be avoided.

Warnings and Precautions

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure.
3. Do not use kit beyond the expiry date.
4. Wear appropriate protective clothing and use appropriate facilities.
5. Do not mouth pipette.
6. Use disposable plasticware where ever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. Sera provided have been tested for antibodies to HIV and for HBsAg and found to be negative. However, they should be treated as potentially infectious materials and capable of transmitting disease. No guarantee is given that the sera are free of infection or microbial contamination.
8. Use distilled water or water of higher quality.
9. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
10. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
11. Do not allow wells to dry out during the assay procedures.
12. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
13. Contaminated plastic ware should be disposed of and incinerated. Contaminated glassware should either be autoclaved at 121 °C for 1 hour or decontaminated with a solution of 2.5 % sodium hypochlorite. All liquid waste should be decontaminated appropriately e.g. using sodium hypochlorite.
14. Do not expose the FITC-conjugate at any stage to strong sunlight, UV or fluorescent light. Keep in a dark place whenever possible.
15. Microbial contaminated serum samples should not be used.
16. In the event that haemolysed or lipemic serum must be used, heat inactive at 56 °C before use.
17. Sodium azide is used as a preservative as marked. It may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. Always dispose of by flushing to drain with plenty of water.

Test Procedure

1. Allow all materials to reach room temperature (at least 20 °C) prior to use.
2. Reconstitute one sachet of PBS powder with 1 litre of distilled water or water of higher quality.
3. Dilute patient samples 1 : 20 with PBS for IgG and IgM testing: Example: 10 µL serum + 190 µL of PBS.

For IgM determination a preabsorption with Rf absorbant (MASTSORB Order Code: 651003) is recommended to reduce interferences e.g. with rheumatic factors. **Do not absorb the controls.**
4. Controls are supplied ready to use and must not be diluted.
5. Carefully remove the required number of slides from their sachets and mark accordingly. Hold the slide at the edge and do not touch the wells. Place the slides in a moist chamber.
6. Apply 20–25 µL of diluted specimens and ready to use controls to respective wells on the slides according to a prepared work format. Ensure that all the wells are covered and that serum does not escape from the wells.

Direct contact of a pipette tip with the slide surface may result in damage to the antigen substrate and should be avoided.
7. Cover the moist chamber and incubate as follows:
IgG assay: room temperature for 30 min
IgM assay: room temperature for 45 min
8. After incubation wash slides carefully with PBS from a wash bottle, taking care not to direct the jet onto the test wells. This may be done by directing the jet of PBS along the centre of the slide, tilting the slide first towards wells 1–5 and then towards 6–10.
9. Immerse the slides in a staining dish or Coplin jar containing PBS and wash for 15 min with a change of PBS after 5 min.
10. Remove slides one at a time from the staining jar and drain off any excess PBS. Using a blotter, dry the area outside wells. Wipe off any excess PBS from the back of the side. Do not touch the well surface.
11. Immediately transfer the slide to a moist chamber and add 20–25 µL of FITC-conjugate (either IgG or IgM) to each well. Ensure that all the wells are covered by the conjugate.
12. Incubate slides at room temperature in a covered moist chamber in the dark for 30 min (same incubation for IgG and IgM).
13. Switch on microscope 15 min prior to use.
14. After incubation wash the slides with PBS as in steps 9 and 10.
15. Optional counter stain: add 3–5 drops of Evans Blue to the PBS wash buffer in the last 5 min washing step. The counter stain increases the contrast of the immunofluorescent pattern.

Briefly wash the slides in PBS to remove all Evans Blue.

16. Apply one small drop of Mounting Medium to each well on a slide. Place a cover slip on the slide and read the results immediately. Take care not to trap air pockets under the cover slip. Excess Mounting Medium on a slide may result in high background fluorescence due to light scattering. Remove excess Mounting Medium with a paper towel avoiding any direct movement of the cover slip.
17. Examine under a fluorescence microscope at a total magnification of 400x to 800x.

Interpretation of Results

Test Validation

Examine the control samples before reading patient samples. The controls must give the following patterns to be valid.

Sample	Fluorescence Intensity
Positive control IgG	3 + to 4 +
Positive control IgM	1 + to 3 +
Negative control	negative

Specimen sera are assessed by way of comparison with the controls included in the test.

Interpretation of Specimen Results

IgG positive specimen should show a green fluorescence of several coarse or fine speckled inclusions ONLY in the cytoplasm of infected cells. Nuclear fluorescence is not considered as positive.

IgG negative specimen should show no green fluorescence; a green staining without fluorescence may be visible.

IgM positive specimen should show a green fluorescence of several coarse or fine speckled inclusions in the cytoplasm of infected cells. A diffuse fluorescence in the cytoplasm of infected and non-infected cells may be found. The intensity of the fluorescence signal is dependent on the antibody concentration.

IgM negative specimen do not show any green fluorescence.

Limitations / Cross reactions

1. Mumps viruses and viruses of the parainfluenza group do show antigen homologies. Especially with parainfluenza type 2 antibody cross-reactions are found. Positive and borderline results should therefore be re-tested with a fresh serum or plasma sample.
2. MASTAFLUOR™ MUMPS has been demonstrated to be highly sensitive and specific, however, results should be considered along with all serological tests, clinical history and other aspects of patient management to be considered diagnostically significant.

Performance

Data in the table were obtained by comparing MASTAFLUOR™ MUMPS results with data or other assays based on a different method (e.g. ELISA):





	IgG	IgM
Sensitivity	94.6 %	50 %
Specificity	86.2 %	98.9 %

Inter-assay and intra-assay variances are not detectable in respect to control fluorescence intensity.

References

1. A; Vidal J; Nebot X; Carbo JM; Navarro G. Prat A; Asenjo MA; Salleras L: Susceptibility to measles, rubella-Med Clin (Barc), 106 (15): 561-4 (1996).
2. Gut JP; Lablache C; Behr S; Kirn A. Symptomatic mumps virus reinfections. J Med Virol, 45 (1): 17-23 (1995).
3. Johnson CE; Kumar ML; Whitwell JK; Staehle BO; Rome LP; Dinakar C; Hurni W; Nalin DR. Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. Pediatr Infect Dis J, 15 (8): 687-92 (1996).
4. King SM; Saunders EF; Petric M; Gold R. Response to measles, mumps and rubella vaccine in paediatric bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant, 17 (4): 633-6 (1996)
5. Matter L; Germann D; Bally F; Schopfer K. Age-stratified seroprevalence of measles, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. Eur J Epidemiol, 13 (1): 61-66, (1997)
6. Pison Garces FJ; Galbe Sanchez-Ventura J; Arcauz Eguren P; Aguirre y Daban C; Mengual Gil J; Larrad Mur L. Immunity to measles, mumps and rubella in children vaccinated with triple viral vaccine. Aten Primaria, 15 (4): 235-7 (1995)

**Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:
 Explanations of abbreviations and icons used on labels:**

SLIDES	Objekträger	Slides
CONTR +	Positive Kontrolle	Positive control
CONTR -	Negative Kontrolle	Negative control
CONJ	FITC-Konjugat	FITC-conjugate
BUFFER	PBS-Puffer	PBS buffer
EVANS BLUE	Evans Blau	Evans Blue
MOUNTING MEDIUM	Eindeckmedium	Mounting Medium
LOT	Charge	Batch
REF	Bestellnummer	Order code
AHG	Anti-Human-Globulin	Anti-human globulin
RTU	Gebrauchsfertig	Ready to use
	Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use
	Wichtige Hinweise beachten	Important notes
	Verfallsdatum	Expiry Date
	Lagerung bei	Storage