

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	2
4. СОСТАВ НАБОРА	3
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	4
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	4
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	5
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	10
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	16
11. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ RUBELLA В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Rubella IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Rubella IgG-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации IgG антител к антигенам Rubella в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Вирус краснухи (Rubella) вызывает легкое заболевание детского возраста с кожными высыпаниями и увеличением затылочных лимфоузлов. В дальнейшем развивается стойкий пожизненный иммунитет. У взрослых, не переболевших краснухой в детстве, болезнь может протекать более тяжело, иногда приводя к развитию транзиторных артритов с тугоподвижностью суставов, описаны случаи летальных энцефалитов. Краснуха у беременных женщин может также вести к серьезным врожденным дефектам плода (пороки сердца, глухота, менингоэнцефалиты, ретинопатии), особенно если заболевание протекает в первый триместр беременности. Инфицирование вирусом краснухи в первый триместр беременности служит показанием к проведению аборта. Исследование протективных сывороточных IgG-антител к вирусу краснухи может быть использовано для оценки иммунного статуса девочек-подростков, а также женщин во время беременности.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG антител к антигенам Rubella основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген - Rubella. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических IgG антител к антигенам Rubella. Концентрация IgG антител к антигенам Rubella в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование высокоочищенного препарата позволяет достичь высокой специфичности анализа.

Для определения количественных характеристик набора реагентов используется международный стандарт RUBI-1-94 (NIBSC, London).

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG антител к антигенам Rubella в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «Rubella IgG-ИФА» не превышает 8,0%.

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P102Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C102Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества IgG антител к антигенам Rubella - 0; 15; 50; 100; 200 МЕ\мл , готовы к использованию (по 1.5 мл каждая)	5	шт	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q102Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG антител к антигенам Rubella, готова к использованию (1.5 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
4	T102Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (1.1 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
5	S01.1Z3	DIL SPE	ИФА-Буфер , готов к использованию (50 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (1.1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (1.1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10	K102I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «Rubella IgG-ИФА»	1	шт.	-
11	K102Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Rubella IgG-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Rubella IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора. Результаты считают действительными, если параметры калибровочного графика соответствуют диапазонам, приведенным в паспорте контроля качества.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 6 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Разбавьте образцы сыоротки (плазмы) крови в 101 раз , используя ИФА-Буфер (S011Z3). Пример: 5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	При количественном учете результатов: внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыоротки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыоротки и исследуемых образцов необходимо производить в течение 5-10 минут.
4	При качественном учете результатов: внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочных проб CAL1, CAL2 и CAL5. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыоротки и исследуемых образцов необходимо производить в течение 5-10 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.

11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реакента, при этом содержащее лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержащего лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержащего лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакента. Бланк фотометра выставьте по воздуху.
13	При количественном учете результатов: постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (X) - концентрация IgG антител к антигенам Rubella в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат (Y) - оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание IgG антител к антигенам Rubella в исследуемых образцах.
15	При качественном учете результатов: 1. Рассчитайте среднее ОП калибровочной пробы CAL2 2. Умножьте это среднее на коэффициент (Q), значение которого указано в Паспорте серии – получите граничное значение оптической плотности (ОПГ); 3. Для каждого образца вычислите коэффициент К, получаемый делением ОП образца на ОПГ. При $K > 1.1$ образец положительный, при $K < 0.9$ - отрицательный. При значении К, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 - результат в пограничной зоне (+/-).

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка (плазма) крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера	100	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

10.2. Некоторые лаборатории на основании результатов собственных популяционных исследований вводят «второй cut-off», расположенный между анамнестическим («нормальным») и «высоким» уровнем IgG-антител, характерным для реактивации или позднего периода первичной инфекции. Значения «второго cut-off» для возрастных групп 8 мес.–3 года и старше 3 лет приведены в таблице ожидаемых значений.

Если значение лежит в интервале от 15.1 МЕ/мл (К от 1.1) до «второго cut-off», это может свидетельствовать либо о начальном периоде первичной инфекции, либо об инфекции, перенесенной ранее. Чтобы прояснить ситуацию, необходимо исследовать повторные образцы крови того же пациента, взятые через несколько недель. Нарастание титра в повторном образце свидетельствует о наличии инфекции. Если же титр не нарастает, это свидетельствует об отсутствии активной инфекции и об анамнестическом характере антител.

Если концентрация в исследуемом образце, превышает значение верхней калибровочной пробы (200 МЕ/мл), его следует дополнительно развести Буфером для разведения образцов в 10 раз и более. При расчете концентрации необходимо умножить полученный результат на Фактор разведения.

Исследуемая группа	Единицы, МЕ/мл		Единицы, К	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Серонегативные	-	15.0	<0.1	0.9
Серопозитивные старше 3 лет	15.1	73.5	1.1	4.9
новорожденные*	-	27.0	<0.1	1.8
до 8 месяцев*	-	48.0	<0.1	3.2
8 месяцев – 3 года	-	60.0	<0.1	4.0

*материнские антитела

Результаты, лежащие в промежутке от 15 МЕ/мл до 25 МЕ/мл указывают на здоровое носительство или начальную стадию инфекции. Требуется повторное обследование через 2 недели.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Center for Disease Control and Prevention. Rubella nad Congenital rubella syndrome: United States, 1994-1997 – MMWR, 1997 – v.46 – p.350-354
2. Knox E. G. Theoretical aspects of rubella vaccination // Rev. Infect. Dis. – 1985 – v.7 - p.194-197
3. Tischer A., Gerike E. Immune response after primary ad revaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella // Vaccine – 2000 – v.18 – p.1382-1392
4. WHO. Guidelines for surveillance of CRS and Rubella // WHO, 1999 – 92 p.
5. Zimmerman L. Chapter 11: Rubella // VPD Surveillance Manual, 3rd edition – 2002 - p.11.1-11.12

По вопросам, касающимся качества Набора **«Rubella IgG-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105043, Москва, а/я 58, тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

**A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION
OF IgG ANTIBODIES TO RUBELLA
IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA**

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG antibodies to Rubella in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of IgG antibodies to Rubella in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Rubella virus infection in children causes a mild disease with skin rash and enlargement of occipital lymph nodes, followed by a stable life-long immunity. In adults the infection may exert in more severe forms with transitory arthritis and in some cases – lethal encephalitis. Rubella infection in pregnant women may cause serious inborn defects in newborns (cardiac insufficiency, meningoencephalitis, retinopathy), especially if infection develops during the 1st trimester.

Rubella infection during the 1st trimester of pregnancy is an indication for abortion. Determination of protective anti-Rubella IgG-antibodies may be used for estimation of immune status in adolescent and pregnant women.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by the antigen. Antibodies from the specimen bind coated antigen on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies directed towards species specific Ig, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP Rubella IgG EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	CAL 1-5 Calibrator set, 1.5 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 15; 50; 100; 200 IU/ml	5	pcs	red(C1 - colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (1.5 ml and 1.5 ml, resp.)	1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
5	DIL SPE EIA buffer 100 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6	SUBS TMB Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21X, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2-8°C or 5 days at RT
8	STOP Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9	N003 Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10	K102I Instruction Rubella IgG EIA	1	pcs		N/A
11	K102Q QC data sheet Rubella IgG EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Dry thermostat for 37 °C ±0,1 °C
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0-3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1.** Reagent Preparation

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 6 wells for the calibrators CAL and control samples CONTROL -, CONTROL + and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Dilute all samples using buffer DIL SPE (EIA buffer) 101 fold. (5 µl of sample + 500 µl of diluent). Do not dilute control sample and calibrators.
3	Pipet 100 µl of calibrators , control sample CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 30 minutes at +37 °C.
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times.
6	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
7	Incubate 30 minutes at +37 °C.
8	Wash the strips 5 times.
9	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
10	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on air.
14	Apply point-by-point method for data reduction.

7.5. Sample processing

Material type	Notes on material collection, storage and handling	Sample dilution example	Sample into the well, µl	Calculation factor
blood serum or plasma	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.	5 µl of sample + 500 µl of diluent	100	1

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of *GLP* (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

Some laboratories, based on their population studies, set up a second cutoff, which stands between anamnestic ('normal') IgG antibody level and 'high' IgG antibody level characteristic of reactivation or late period of primary infection. Recommended values for this second cut-off for two age groups (8 months – 3 year, > 3 years) are presented in the table below.

10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Rubella IgG. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below).

Sex, age	Units, IU/ml	
	Lower limit	Upper limit
Seronegative	-	15.0
Seropositive > 3 years	15.1	73.5
newborn*	-	27.0
under 8 months*	-	48.0
8 months - 3 years	-	60.0

*antibodies of maternal origin

11. LITERATURE

1. Center for Disease Control and Prevention. Rubella nad Congenital rubella syndrome: United States, 1994-1997 – MMWR, 1997 – v.46 – p.350-354
2. Knox E. G. Theoretical aspects of rubella vaccination // Rev. Infect. Dis. – 1985 - v.7 - p.194-197
3. Tischer A., Gerike E. Immune response after primary ad revaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella // Vaccine – 2000 – v.18 - p.1382-1392
4. WHO. Guidelines for surveillance of CRS and Rubella // WHO, 1999 – 92 p.
5. Zimmerman L. Chapter 11: Rubella // VPD Surveillance Manual, 3rd edition - 2002 - p.11.1-11.12