

СОДЕРЖАНИЕ

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

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	9
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	14
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

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

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Краснуха (Rubella) – вирусное инфекционное заболевание, которое характеризуется высыпаниями на коже, генерализированной лимфаденопатией, умеренной интоксикацией и непродолжительной лихорадкой. Обычно заболевание протекает быстро и в легкой форме. Особое значение краснухи как инфекционного заболевания связано с опасностью тяжелых осложнений для ребенка, которые могут развиваться при инфицировании матери в период беременности.

1.3. В виду того, что симптомы краснухи часто мало выражены, а в 30–50% случаев заболевание протекает без заметных проявлений, важное значение имеют лабораторные методы диагностики этой инфекции.

1.4. После вакцинации, как и при первичном инфицировании вирусом краснухи, первыми в крови появляются специфические антитела IgM, которые являются свидетельством репликации вируса в организме человека. После заражения специфические антитела IgM появляются на 3–5 сутки после появления высыпаний, а после вакцинации антитела этого класса начинают появляться на 3–4 неделе и присутствуют в крови в течение нескольких недель. Специфические антитела IgG появляются в крови на 7–10 сутки от момента клинических проявлений, достигают максимума через 4–5 недель и остаются на высоком уровне в течение длительного времени.

1.5. Надежным доказательством острой краснушной инфекции является наличие в сыворотке специфических антител IgM, которые также считаются доказательством врожденной краснухи у новорожденных.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgM антител к антигенам Rubella основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к IgM. Антитела из образца связываются с антителами к IgM на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата антигена Rubella 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 IgM антител к антигенам Rubella в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) IgM антител к антигенам Rubella в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность и чувствительность. Набор реагентов «Rubella IgM-ИФА» определяет коммерческую панель сывороток Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201 производства Boston Biomedica Company (США) в соответствии с паспортными данными и коррелирует со значениями, полученными на наборе реагентов Abbott EIA Rubella-IgM (lot 06143M100). Панель содержит 5 положительных и 22 отрицательных образцов. При исследовании специфичности с использованием 55 сывороток, отрицательных на IgM антитела к антигенам Rubella на наборах реагентов DiaSorin (Италия) и NovaTec (Германия), все образцы были определены как отрицательные.

3.2. Воспроизводимость.

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

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях набора реагентов «Rubella IgM-ИФА» (Intra-assay)

Образец, №	Кол-во повторов	Значение, ОП средняя	CV1, %	CV2, %
1	32	0.598	6.7	5.8
2	32	1.732	6.1	4.8

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии набора реагентов «Rubella IgM-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

Образец, №	Кол-во повторов	Значение, ОП средняя	CV1, %
1	8	0.631	7.1
2	8	1.82	5.2

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание	
1	P10MZ	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	CN102MZ CP102MZ	CONTROL – CONTROL+	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgM антител к антигенам Rubella, готовы к использованию (0.5 мл и 0.2 мл соответственно)	2	шт.	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T102MZ	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
4	S011Z	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензида (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003		Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K102MI		Инструкция по применению Набора реагентов «Rubella IgM-ИФА»	1	шт.	-
10	K102MQ		Паспорт контроля качества Набора реагентов «Rubella IgM-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 10–250 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.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. 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 IgM-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

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб 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;
- контрольные сыворотки 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.

8.7. Допускается проведение анализа в монопликатах при использовании автоматического или полуавтоматического анализаторов.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка)
2	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл ИФА-Буфера.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.
4	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.

5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 60 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-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
13	Рассчитайте содержание IgM антител к антигенам Rubella в исследуемых образцах. Для этого: 1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля: $\text{ОП (CN102MZ)Cp} = (\text{ОП1 (CN102MZ)} + \text{ОП2 (CN102MZ)} + \text{ОП3 (CN102MZ)}) / 3;$ Результаты анализа считать достоверными, если - ОП Положительного контроля не ниже 1.5 оптических единиц (ОЕ) - ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках 2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2 $\text{Cut off} = \text{ОП (CN102MZ)Cp} + 0.2$ 3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off $\text{ИП} = \text{ОП образца} / \text{Cut off}$

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.

Интерпретация результатов:

При ИП > 1.1 образец положительный,

при ИП < 0.9 – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

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 IgM-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 qualitative determination of IgM antibodies to Rubella in human serum or plasma

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM antibodies to Rubella in serum or plasma.

This kit is designed for measurement of IgM antibodies to Rubella in 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 46 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Measles (Rubella) is a viral infection characterized by skin rash, generalized lymphadenopathy, a moderate intoxication and a short-term fever. Usually, the disease has a mild course and resolves shortly. The importance of measles as an infectious disease is caused by severe consequences for a fetus in case of maternal infection during pregnancy.

Importance of laboratory diagnostics of measles is stressed by the fact that the symptoms of the disease are often mild – moreover, in 30-50% of cases they are occult.

Both after vaccination and after a primary infection by Rubella virus, specific IgM antibodies are the first to appear and being indicative of viral replication in the human body. Following infection, Rubella-specific IgM in blood appear on day 3-5 after development of skin rash, while following vaccination they appear in 3-4 weeks and may be found during several weeks. Rubella-specific IgG appear on day 7-10 after development of clinical symptoms, reach their maximum in 4-5 weeks and remain in high titer during a long time.

Rubella-specific IgM is a reliable sign of an acute Rubella infection as well as a proof of an intra-uterine infection in newborns.

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 murine monoclonal antibodies to IgM. Antibodies from the specimen bind coated murine monoclonal antibodies to IgM on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Rubella, labelled with peroxidase enzyme, is 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. Positivity index (PI, %) is calculated by the formula (see Calculations). 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	Rubella IgM EIA strips, 8x12 wells	polystyrene microwells coated with murine monoclonal antibodies to IgM	1	pcs	until exp. date	
2	CONTROL -, CONTROL +	(CONTROL-) dilution of preselected human serum, not containing IgM antibodies to Rubella with preservative - 0,01% Bromidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless; (CONTROL+) dilution of preselected human serum with high content of human IgM antibodies to Rubella with preservative - 0,01% Bromidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye	2	pcs	colourless ; red 2 months	
3	CONJ HRP	Solution of Rubella coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and bright red dye	1	pcs	red	until exp. date
4	DIL	phosphate buffered Saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative; contains blue dye	1	pcs	blue	until exp. date
5	SUBS TMB	ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 21X	aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT
7	STOP	5,0% vol/vol solution of sulphuric acid	1	pcs	colourless	until exp. date
8	N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	K102MI	Instruction Rubella IgM EIA	1	pcs		N/A
10	K102MQ	QC data sheet Rubella IgM 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;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C
- 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...+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. Alternative units:**7.5. Assay procedure**

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 4 wells for control samples CONTROL -, CONTROL + (3 and 1 wells resp.) and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 90 µl of EIA buffer into each well.
3	Pipet 10 µl of control samples CONTROL -, CONTROL + and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 60 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

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.

For the assay to be valid, the following requirements should be met:

1. OD450 for CONTROL+ should be ≥ 1.5 AU.
2. OD450 for CONTROL- should not be more than 0.15 AU for all replicates.
3. OD450 for any CONTROL- replicate should be within 50%-150% of the mean OD450 value for CONTROL-. If any value lies outside this range (although meets requirement #2), it should be discarded and not used for calculation of the mean OD450 value for CONTROL-

9. CALCULATION OF RESULTS

9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for CONTROL- in triplicates and each pair of samples.

9.2. Calculate the cut-off value: (mean OD450 for CONTROL-) $\times 0.2$

9.3. Calculate Positivity Index (PI) for each sample:

$PI = \text{mean OD450}(\text{sample}) / \text{Cut-off}$

10. EXPECTED VALUES

If PI value is greater than 1.1, the result is POSITIVE.

If PI value is less than 0.9, the result is NEGATIVE.

If PI value is between 0.9 and 1.1, the result is EQUIVOCAL. Such samples should be retested. If the result is equivocal again, a new sample should be obtained 2-4 weeks later and tested again. If the result remains equivocal, the sample should be considered negative. Therapeutic 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 therapeutic measures.

NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity

Specificity of the test was evaluated on 55 serum specimens found negative in DiaSorin (Italy) and NovaTec (Germany). All tested specimens were found negative. Based on these data, specificity of the test is 100%

11.2. Analytical sensitivity

The kit Rubella IgM EIA was evaluated using panel of naturally occurring serum and plasma specimens from Boston Biomedica, Inc (Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201)

11.3. Precision

Intra-assay precision is shown below:

Serum, no	duplicated	value, K	CV1, %	CV2, %
1	32	0.598	6.7	5.8
2	32	1.732	6.1	4.8

Inter-assay precision is shown below:

Serum, no	duplicated	value, K	CV, %
1	8	0.631	7.1
2	8	1.82	5.2

12. 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

