



*ENZYWELL*

**RUBELLA IgG**

**REF 91030 (96 tests)**

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



**INDICE / INDEX**

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY
15. PRECISIONE / PRECISION
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING"
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

**RIECCO**  
**RIECCO**  
 ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL**  
**RUBELLA IgG**

REF 91030

(Italiano)

**1. UTILIZZAZIONE**

**KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI VIRUS DELLA ROSOLIA NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA RUBELLA VIRUS.**

**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 sieroconversione.

Esistono numerosi metodi per effettuare il dosaggio delle immunoglobuline specifiche.

L'Elisa è una di queste ed ha il vantaggio della completa automazione.

**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 (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. 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 perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

**4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

**MT PLATE** MICROPIASTRA. 12x8 pozzetti sensibilizzati con virus della Rosolia (colorate in rosso).

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (R, seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips 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** CONIUGATO. 1 x 16 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.

**CAL** CALIBRATORI. 5 x 1,6 mL.

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-Rosolia IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione. Le UI/mL sono calcolate in riferimento alla 1<sup>st</sup> International Standard Preparation. Il Calibratore 2 (10 UI/mL) corrisponde al Cut-off e può essere usato per l'analisi qualitativa. I valori dei calibratori sono 5, 10, 50, 100, 200 UI/mL.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**CONTROL - IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF933910).** 1 x 1,6 mL. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano, privo di anticorpi anti-Rubella IgG, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione (Calibratore 0).

**WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 1 x 100 mL. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

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

Preparazione: Diluire il volume richiesto 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 DILUENTE 2 (PF93611). 1 x 100 mL. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

**SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 12 mL. Pronto all'uso. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 16 mL. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 ul di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

**5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' 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	6 settimane 2/8°C busta di polietilene
SIERI DI CONTROLLO	6 settimane 2/8°C
CONIUGATO	6 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C, al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
STOP SOLUTION	fino alla scadenza a 2/8°C

**6. PRECAUZIONI**

**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C**

**Attenzione:**

*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) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi: diluire con molta acqua per la sua eliminazione

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 CO<sub>2</sub>.
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 da sangue prelevato 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 e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore (56°C per 30') 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 H<sub>2</sub>O).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).

In uno strip porre i calibratori NON DILUITI possibilmente in duplicato (100 µL per pozzetto). Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. 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. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

<b>9. Schema del protocollo di prova per RUBELLA IgG</b>
--

### **Tecnica manuale**

- |        |   |
|--------|---|
| STEP 1 | Mettere 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip. |
|        | -   |
|        | incubare 45 min. a 37°C   |
|        | -   |
|        | lavare 4 volte (300 µl)   |
|        | -   |
| STEP 2 | Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto                            |
|        | -   |
|        | incubare 45 min. a 37°C   |
|        | -   |
|        | lavare 4 volte (300 µl)   |
|        | -   |
| STEP 3 | Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto                            |
|        | -   |
|        | incubare 15 min. a t.a.   |
|        | -   |
| STEP 4 | Aggiungere 100 µL di Stop Solution                                  |
|        | -   |
|        | leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.                               |

## **10. VALIDAZIONE DEL TEST**

1. **CONTROL - (Calibratore 0):** la densità ottica (O.D.) del controllo negativo deve essere  $\leq 0,6$  volte la D.O. del Calibratore 2.
2. La D.O. del Calibratore 2 maggiore o uguale 0,2 a 450 nm ;  $\geq 0,16$  a 450/620 nm.
3. La D.O. del Calibratore 5 deve essere  $\geq 1,5$ .

## **11. INTERPRETAZIONE DEL TEST**

### **Risultati quantitativi**

Sottrarre il bianco ( $\leq 0,150$ ) da ciascuna densità ottica ottenuta. Riportare in grafico il valore di assorbanza dei 6 calibratori (asse y) in funzione delle concentrazioni (asse x) IU/ml, ottenute in riferimento al "Primo Standard Internazionale"). Costruire la curva standard ed ottenere la concentrazione del campione in esame per interpolazione.

NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.

Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Il grado di immunità del siero in esame può essere interpretato come segue:

*IMMUNE*: quando la concentrazione di IgG nel campione è >13 UI/mL

*NON IMMUNE*: se la concentrazione è <7 UI/mL

*DUBBIO*: se la concentrazione è nel range 7-13 UI/mL. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

#### Risultati qualitativi

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (Calibratore 2). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.3.

Dubbio: > 0.7 – <1.3.

Negativo: quando il rapporto è < 0.7.

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

### **12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Il livello delle IgM anti-Rubella dovrebbe essere determinato usando il kit Enzywell Rubella IgM (cod. 91031). Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG. Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre procedure diagnostiche.

Sebbene i sieri di controllo contenuti nel kit siano calibrati secondo il siero di riferimento della O.M.S., certe discordanze possono osservarsi quando lo stesso siero viene testato con tecniche analitiche diverse.

### **13. SPECIFICITA' ANALITICA**

Sono stati testati 17 campioni non contenenti anticorpi IgG anti-Rubella ma contenenti anticorpi IgG contro virus quali quello del Cytomegalovirus, Epstein Barr, Herpes Simplex, Parotite. In nessun caso la presenza di tali anticorpi influenzava il test.

### **14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA**

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 260 campioni, di cui 32 risultavano negativi, 220 positivi e 8 dubbi. Il metodo di confronto era la tecnica IHA.

Un titolo di 1/8 in IHA era considerato corrispondente al Cut-off in quanto nel laboratorio della sperimentazione non si giudicava indice di protezione sicura.

Nella sperimentazione si sono trovati 8 campioni 1/8. Il kit Enzywell aveva un campione falso positivo. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 1**

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	227	1
	-	0	32

Il kit Enzywell ha una sensibilità del 100% ed una specificità diagnostica del 97,0%.

### **15. PRECISIONE**

**Tabella 2 Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi**

Cut Off	N = 21	Lotto 119	Lotto 120	Lotto 121
O.D.		0.321	0.383	0.417
CV%		4.36	6.78	5.1

**Tabella 3 Precisione tra sedute**

Campione	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

Il CV% ottenuto sul titolo dei campioni 2 e 3 risultava essere rispettivamente 18.1 e 11.7%.

**Tabella 4 Precisione tra lotti**

	IU/ml			CV%
	Numero di lotto			
Campione	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

**16. 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
	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. REFERENCES**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



**DIESSE Diagnostica Senese**  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena) Italy





## ENZYWELL RUBELLA IgG

REF 91030

(English)

### 1. INTENDED USE

**IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO RUBELLA IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF RUBELLA VIRUS INFECTION.**

### 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. Several methods are employed for the assay of specific immunoglobulins. Of these methods, the ELISA technique offers the advantage of being completely automated.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-3).

The purified and inactivated Rubella virus antigen is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added.

The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

### 4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring reagents to room temperature before use.**

**MT PLATE** *MICROPLATE. 12x8 wells coated with Rubella Virus (coloured in red).*

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

**CONJ CONJUGATE.** *1x16 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.

**CAL CALIBRATORS.** *5 x 1.6 mL.*

Contents: Diluted human serum at known concentration of anti-Rubella IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide, liquid, ready for use without further dilution. The International Units are calculated according to the **1<sup>st</sup> International Standard Preparation**. Calibrator 2 (10 IU/mL) corresponds to the cut-off value and can be used in the qualitative test. The calibrators have the following values: 5, 10, 50, 100, 200 IU/mL.

Colour: the colour of the calibrators is proportional to the relative antibody titer.

**CONTROL** - *IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS*

Contents: Human serum not 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 (Calibrator 0).

**WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 mL. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

Preparation: dilute the required volume 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 DILUENT 2 (PF93611). 1 x 100 mL. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

**SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619). 12 mL. Ready for use. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602). 1x16 mL. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.**

- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm and 405 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 and tips with an accuracy of ± 2%
- 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	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control sera	6 weeks at 2/8°C
Conjugate	6 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	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°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 controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides; dilute with large amounts of water to eliminate.

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. CO<sub>2</sub> 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, and can be thawed a maximum of 3 times. Defrosted samples must be carefully mixed before the assay. Heat inactivation (56°C for 30') can give rise to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which can lead to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation (3000 rpm x 10').

**The test cannot be performed on human plasma.**

## **8. TEST PROCEDURE**

### **Manual Technique**

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent.

Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED calibrators preferably in duplicate in a strip (100 µL in each well). Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl), add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well. After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min. Take the reading again at 405 nm if there are OD values higher than 2,000.

<b>9. Test procedure for Rubella IgG</b>
--

- |        |  |
|--------|--|
| STEP 1 | Place 100 µL of diluted sample//controls to the wells of the strips.<br>-<br>Incubate for 45 min. at 37°C<br>-<br>Wash 4 times (300 µl)<br>- |
| STEP 2 | Add 100 µL of conjugate to each well<br>-<br>Incubate for 45 min. at 37°C<br>-<br>Wash 4 times (300 µl )<br>-                                |
| STEP 3 | Add 100 µL of Substrate to each well<br>-<br>Incubate for 15 min. at R.T.<br>-   |
| STEP 4 | Add 100 µL of Stop Solution<br>-<br>Read absorbance at 450 nm within 30 min  |

## **10. TEST VALIDATION**

1. **CONTROL** - (Calibrator 0): the optical density (O.D.) of the negative control must be  $\leq 0,6$  times the O.D. of Calibrator 2.
2. The O.D. of Calibrator 2 must be  $\geq 0,2$  at 450 nm;  $\geq 0.16$  at 450/620 nm.
3. The O.D. of Calibrator 5 must be  $\geq 1.5$ .

## **11. INTERPRETATION OF RESULTS**

### **Quantitative Results**

Subtract the blank ( $\leq 0.150$ ) from each O.D. obtained. Report on a graph the absorbance of the 6 calibrators (y axis) and the concentrations (x axis) in IU/ml, obtained in reference to the First International Standard. Construct a standard curve and calculate the concentration of the test sample by interpolation.

NOTE: A standard curve must be performed for each run.

If the O.D. of a serum or calibrator is higher than 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the result by 3.

The degree of immunity is interpreted as follows:

*IMMUNE*: when the IgG concentration in the sample is > 13 IU/mL

*NON IMMUNE*: if the concentration is <7 IU/mL

*DOUBTFUL*: if the concentration ranges between 7 and 13.

### **Qualitative Results**

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (Calibrator 2). The sample is considered:

**Positive**: if the ratio is > 1.3.

**Doubtful**: if the ratio is  $\geq 0.7$  but  $\leq 1.3$ .

**Negative**: if the ratio is < 0.7.

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

## **12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

The Rubella IgM level should be determined using Enzywell Rubella IgM kit (code 91031). Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level. The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

Although the control sera used in the kit are calibrated to WHO reference serum, certain discordances of results may be observed when the same serum is tested by different analytical techniques.

## **13. ANALYTICAL SPECIFICITY**

17 samples not containing anti-Rubella igG but containing IgG antibodies against viruses such as Cytomegalovirus, Epstein Barr, Herpes Simplex, Mumps. In no case was the result of the test influenced by these antibodies.

## **14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY**

260 samples were analysed, 220 of which were positive, 32 negative and 8 doubtful. The comparative method was the IHA technique.

A titre of 1/8 was considered to correspond to the cut-off value, in as far this titer was not considered a sure index of protection in the laboratory performing the trial.

In the evaluation, 8 samples were tested with a titer of 1/8; Diesse had 1 false positive sample. The results are summarized in the following **Table 1**.

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	227	1
	-	0	32

The Enzywell kit had a diagnostic sensitivity of 100% and a diagnostic specificity of 97.0%.

## **15. PRECISION**

**Table 2 Within-run precision performed on 3 different batches**

Cut Off	N = 21	Lot 119	Lot 120	Lot 121
O.D.		0.321	0.383	0.417
CV%		4.36	6.78	5.1

**Table 3 "Between-run" Precision**

Sample	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

The CV% obtained on the samples 2 and 3 was respectively 18.2 and 11.7%.

**Table 4 Precision between batches**

	IU/ml			CV%
	Batch number			
Sample	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

**16. 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 paragraph 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 temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

**17. REFERENCES**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



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