MASTAFLUOR™ MASERN

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

Immunofluorescence assay for the detection of antibodies to measles virus in human serum and plasma

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

CE

Deutsch: Seiten 02–04

English: Pages 05–07

MASTAFLUOR™ Masern / Measles IgG	REF 636320	10 x 5 Tests
MASTAFLUOR™ Masern / Measles IgG	REF 636322	10 x 10 Tests
MASTAFLUOR™ Masern / Measles IgM	REF 636321	10 x 5 Tests
MASTAFLUOR™ Masern / Measles IgM	REF 636323	10 x 10 Tests

Hersteller / Manufactured by:

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

Distributed by:

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

Distribué per:

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

Einführung

Masern stellen eine stark ansteckende Viruserkrankung dar, die klinisch durch ein ausgeprägtes prodromales Fieber, Schnupfen, Konjunktivitis, Husten und ein pathognomisches Exanthem (Kopliksche Flecken) gekennzeichnet ist. Die Krankheit entsteht durch eine Infektion mit dem Masernvirus, das zu dem Genus Morbillivirus und der Familie Paramyxoviridae gehört.

Zehn bis zwölf Tage nach der Infektion erscheinen die sehr deutlichen und charakteristischen prodromalen Symptome: Schnupfen, persistierender „bellender" Husten, Keratokonjunktivitis, oft verbunden mit Photophobie und Fieber. Im allgemeinen treten auch Lymphadenopathie und Splenomegalie auf. Während dieser Phase erscheinen Kopliksche Flecken auf der Wangenschleimhaut, die sich schnell ausbreiten. Diese Flecken sind in der Regel verschwunden, wenn die Hautrötung ihren Höhepunkt erreicht. Die Hautrötung tritt nach einem 3–5tägigen Prodromalstadium auf, etwa 14 Tage nach der Ansteckung. Der Ausschlag entwickelt sich makulopapulär und breitet sich innerhalb der nächsten 3 Tage schnell über Gesicht, Hals, Rumpf und Extremitäten aus. Auf dem Höhepunkt zeigt sich eine tiefrote Farbe, die mit einem Ödem der Haut assoziiert werden kann. Komplikationen bei Masern können eine Folge der Virusreplikation oder von sekundären bakteriellen Infektionen sein. Die häufigsten Komplikationen sind: Otitis media, Pneumonie und Enzephalitis. Masern sind bei jüngeren oder unterernährten Kindern ausgeprägter; hier treten auch hämorrhagische Bilder mit 5 % bis 10 % an letalen Fällen auf. Bei Menschen, die mit dem inaktivierten Virus geimpft wurden (vor 1968), können die Infektionen schwere Folgen haben, wie zum Beispiel Pneumonie, periphere Ödeme, Pleuralerguss und atypische Rötung. Masern sind eine der ansteckendsten Infektionskrankheiten. Das Virus breitet sich über Tröpfchen aus dem Respirationstrakt von infizierten Personen oder durch direkten Kontakt aus. Das Vorkommen von Masern hat seit der Einführung von Impfprogrammen abgenommen.

Verwendungszweck

Der MASTAFLUOR™ Masern ist ein Immunfluoreszenztest zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Masernvirus.

Testprinzip

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

Packungsinhalt

Inhalt	100 Tests	50 Tests	Spezifikation
Objektträger	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Beschichtet mit Masernvirus infizierten Rita Affennieren-Zellen
Positives Kontrollserum	0,5 mL	0,5 mL	IgG- oder IgM-positives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN_3
Negatives Kontrollserum	0,5 mL	0,5 mL	IgG- und IgM-negatives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN_3
FITC-Konjugat	3 mL	2 mL	FITC-markiertes Anti-human-IgG (γ-Kette) oder FITC-markiertes Anti-human-IgM (μ-Kette); gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN_3
Evans Blue	3 mL	3 mL	Gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN_3
Eindeck-medium	3 mL	3 mL	Gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN_3
PBS	2 Sachets	2 Sachets	Je 1 Sachet in 1 L destilliertem Wasser lösen, pH 7,2 ± 0,2

Zusätzlich benötigte Materialien

Sterile Reaktionsgefäße

Mikropipetten und dazu passende Spitzen

Küvetten

Feuchte Kammer

Messkolben oder Messbecher

Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

Pinzette

Deckgläser

(Wasch-) Pufferflasche

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

Haltbarkeit und Lagerung

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

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

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

Warnhinweise

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

Testdurchführung

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

   Für die IgM-Bestimmung wird eine Präabsorption mit MASTSORB (Kat.-Nr.: 651003) empfohlen, um z.B. eine Störung durch Rheumafaktoren zu minimieren.
   Kontrollen dürfen nicht absorbiert werden.
4. Die Kit-Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden.
5. Den eingeschweißten Objektträger an der Einkerbung aufreißen und vorsichtig aus der Alutüte herausnehmen.
6. Je 20–25 µL der Kontrollen oder der verdünnten Patientenproben auf ein Testfeld pipettieren. Die Probe soll das ganze Testfeld bedecken. Mit der Pipettenspitze dabei nicht über das Testfeld kratzen.
7. Die Objektträger in eine feuchte Kammer legen.

   IgG-Ansätze 30 min / IgM-Ansätze 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Nach der Inkubation die Objektträger vorsichtig aus der feuchten Kammer nehmen und mit PBS aus einer Spritzflasche vorsichtig auf die Mitte des Objektträgers zielen, um die Seren von den Testfeldern abzuspülen. Dabei nie direkt mit dem Spritzstrahl auf die Testfelder zielen.
9. Die Objektträger in einer Küvette mit PBS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur waschen. Ein Wechseln des Puffers nach 5 min erhöht die Waschstringenz.
10. Die Objektträger aus dem Puffer nehmen und den Puffer kurz von der Maske abklopfen, indem man mit der Längsseite des Objektträgers auf eine saugfähige Unterlage klopft. Nie mit einem Papiertuch o.ä. über die Testfelder wischen!
11. Die Objektträger sofort in die feuchte Kammer legen und einen Tropfen des entsprechenden FITC-Konjugats (20–25 µL) auf jedes Testfeld tropfen. Das Konjugat soll das ganze Testfeld bedecken. Die Testfelder dürfen nach dem Waschschritt zu keinem Zeitpunkt eintrocknen!
12. Die Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur inkubieren (gilt für IgG- und IgM-Ansätze).
13. Es empfiehlt sich, das Mikroskop etwa 10–15 min vor Ablauf der Konjugatinkubation anzuschalten, damit die Lampe einbrennen kann. Bitte stets die Betriebsanleitung des Mikroskops beachten.
14. Nach der Konjugatinkubation die Objektträger wie unter den Pkt. 9 und 10 beschrieben waschen.
15. Optional können dem letzten Waschschritt 3–5 Tropfen Evans Blue zur Gegenfärbung zugegeben werden. Mit der Gegenfärbung erreicht man eine stärkere Kontrastierung des Präparates.

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

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

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

17. Die Reaktionen können nun mit einem Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es empfiehlt sich dabei eine 400- bis 500-fache Vergrößerung.

Interpretation der Reaktionen

Validierung des Tests

Die Kontrollen müssen folgende Reaktionen zeigen:

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

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

Interpretation der Patientenreaktionen

IgG-positive Proben zeigen in der 1:20 Suchverdünnung eine homogene grüne Fluoreszenz des Cytoplasmas und der cytoplasmatischen Einschlüsse NUR in infizierten Zellen.

IgG-negative Proben zeigen in der 1:20 Suchverdünnung keine oder nur eine mattgrüne Fluoreszenz.

IgM-positive Proben zeigen in der 1:20 Suchverdünnung eine homogene grüne Fluoreszenz des Cytoplasmas und der cytoplasmatischen Einschlüsse in infizierten Zellen. Eine diffuse Fluoreszenz im Cytoplasma der infizierten und nicht-infizierten Zellen ist möglich. Die Fluoreszenzstärke ist abhängig von der Antikörperkonzentration.

IgM-negative Proben zeigen in der 1:20 Suchverdünnung keine Fluoreszenz.

Antikörper gegen die Hauptvirusantigene treten 2–4 Tage nach Ausbruch des Exanthems auf. Zunächst werden IgM-Antikörper gebildet, die ca. 4–5 Wochen nachweisbar sind. Im Verlauf von 2–4 Wochen erfolgt ein deutlich nachweisbarer IgG-Anstieg; IgG-Antikörper bleiben auch nach graduellem Abfall der Titer lebenslang nachweisbar. Nach Impfung mit einem Lebendimpfstoff ist die Antikörperproduktion geringer, doch auch hier kommt es in etwa 90 % der Fälle zu einer Serokonversion, die IgG-Antikörper persisitieren lebenslang. Reinfektionen ohne klinische Symptome aber mit nachweisbarem Titeranstieg sind möglich.

Titer IgG	Titer IgM	Interpretation	Empfehlung
≥ 1:40	≥ 1:40	frische oder vor kurzem erfolgte Infektion wahrscheinlich; Reaktivierung bzw. vor kurzem erfolgte Immunisierung möglich	Verlaufskontrolle der IgG- u. IgM-Antikörper (Proben im Abstand von 3-4 Wochen genommen), Serokonversion aufzeigen; Bestätigungsteste
≥ 1:40	neg	lange zurückliegende Infektion wahrscheinlich, Reinfektion möglich	Verlaufskontrolle der IgG-Antikörper, ein signifikanter Titeranstieg bei Fehlen von IgM-Antikörpern lässt auf eine Reinfektion schließen

Proben, die in der Verdünnung des Suchtiters zu grenzwertigen Ergebnissen führen, sollten mit einer neuen Probe erneut getestet werden. Eine Verlaufskontrolle liefert zudem Hinweise, die auf eine unspezifische Reaktion schließen lassen können.

Grenzen des Nachweisverfahren / Kreuzreaktionen

1. Eine Fluoreszenz in allen Zellen (Kern oder Cytoplasma) kann entweder durch Autoimmun-Antikörper (ANA, AMA, etc.) oder durch unspezifische Reaktionen nicht-immunologlischer Art z. B. durch fluorochromgebundene Proteine bedingt sein.
2. Der MASTAFLUOR™ Masern ist hoch-sensitiv und hoch-spezifisch. Dennoch sollte auch dieser Test wie auch jeder andere Labortest nicht allein zur Festlegung der Diagnose verwendet werden, sondern immer in Verbindung mit anderen Testverfahren, der Anamnese und dem klinischen Bild des Patienten.

Leistungsdaten

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

	IgG	IgM
Sensitivität	95,8 %	42,8 %
Spezifität	55,5 %	98,8 %

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

Literatur

1. Gerike E., Tischer A., in: Diagnostische Bibliothek Vol 18, 1993, Blackwell Wissenschaftsverlag
2. Thomas L., Labor und Diagnose, 5. Auflage TH-Verlag, 1998
3. Fields, Virology, Third Edition, Lippencott-Raven, 1996

Introduction

Measles is a highly contagious viral disease characterised by a clinically distinct prodrome of fever, coryza, conjunctivitis, cough and a pathognomic exanthem (Koplik`s spots). The disease is the result of infection with the measles virus, genus Morbillivirus of the family Paramyxoviridae.

Ten to twelve days after infection, the most prominent and characteristic prodromal symptoms appear: Coryza, a persistant barking cough, keratoconjunctivitis often with photophobia and fever. Generally lymphadenopathy and splenomegaly are also frequent. During this period, Koplik`s spots appear on the bucal mucosa that rapidly spread involving the entire mucous membrane. These spots are usually gone by the time the skin rash reaches its peak. The rash of Measles appears after a 3 to 5 days prodrome some 14 days after exposure. The rash quickly becomes maculopapular and spreads rapidly over the face, neck, trunk and extremities during the next three days. At its height, the eruption has generally deepened to a redish purple and may be associated with edema of the skin. Complications are: Otitis media, pneumonia and encephalitis. Measles have a more severe expression in younger or undernourished children with a higher incidence of hemorrhage Measles with 5 to 10 % of lethal cases.

In people who have been vaccinated with inactive virus (before 1968) the infection can have severe manifestations as: Pneumonia, peripheral edema, pleural effusion and atypical rash. Measles are one of the most contagious infectious diseases. The virus spreads through droplets emanating from the respiratory tract of infected persons or by direct contact. The incidence of measles has declined since the introduction of vaccination programs

Intended Use

MASTAFLUOR™ Measles slides and kits provide an indirect immunofluorescence test system for the detection of specific antibodies to Measles virus antigen.

Test Principle

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

Kit Contents

Content	100 Tests	50 Tests	Specifications
Slides	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Coated with Measles virus infected Rita primate kidney cells
Positive control	0.5 mL	0.5 mL	IgG or IgM positive serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN_3
Negative control	0.5 mL	0.5 mL	IgG and IgM negative serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN_3
FITC-conjugate	3 mL	2 mL	Anti-human-IgG (γ-chain) FITC-conjugate or anti-human-IgM (μ-chain) FITC-conjugate, ready to use, contains < 0.1 % NaN_3
Evans Blue	3 mL	3 mL	Ready to use, contains < 0.1 % NaN_3
Mounting Medium	3 mL	3 mL	Ready to use, contains < 0.1 % NaN_3
PBS	2 Sachets	2 Sachets	1 sachet to be diluted in 1 L of distilled water, pH 7.2 ± 0.2

Materials Required but not Provided

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

Stability and Storage

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

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

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

Warnings and Precautions

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

Test Procedure

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

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

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

    Briefly wash the slides in PBS to remove all Evans Blue.
16. Apply one small drop of Mounting Medium to each well on a slide. Place a cover slip on the slide and read the results immediately. Take care not to trap air pockets

under the cover slip.

Excess Mounting Medium on a slide may result in high background fluorescence due to light scattering. Remove excess Mounting Medium with a paper towel avoiding any direct movement of the cover slip.

17. Examine under a fluorescence microscope at a total magnification of 400x to 500x.

Interpretation of Results

Test Validation

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

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

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

Interpretation of Specimen Results

IgG positive specimens should show in a 1:20 dilution a green homogenous fluorescence of cytoplasm and of inclusions in the cytoplasm of infected cells. Nuclear fluorescence is not considered as positive.

IgG negative specimens should not show in a 1:20 dilution a green fluorescence; a green staining without fluorescence may be visible.

IgM positive specimens should show in a 1:20 dilution a green fluorescence of several coarse or fine speckled inclusions in the cytoplasm of infected cells. A diffuse fluorescence in the cytoplasm of infected and non-infected cells may be found. The intensity of the fluorescence signal is dependent on the antibody concentration.

IgM negative specimens do not show any green fluorescence.

Diagnostic Relevance

Antibodies to all the main virus antigens appear 2–4 days after the appearance of the exanthem. IgM antibodies are produced first and these remain for approx. 4–5 weeks. In the course of 2–4 weeks a clear increase in IgG antibody titer is observed which persists lifelong following a gradual decrease. Following vaccination using live vaccine the production of antibodies is lower but even then in 90 % of the cases a seroconversion is observed and the IgG antibodies remain lifelong. Reinfection with a titer increase is possible even without clinical symptoms. In SSPE (subactue sclerosing panencephalitis) IgG titer is many times higher for recovery from a measles infection (10 to 100 times). Where encephalitis or SSPE is suspected additional CSF testing is recommended.

Serological findings of a measles infection are strongly dependent on the stage and duration of the clinical symptoms.

Titer IgG	Titer IgM	Interpretation	Recommendation
≥ 1:40	≥ 1:40	Acute or recent infection quite likely, reactivation or recent immunisation possible	Monitoring of IgG and IgM antibodies (sample collection within 3-4 weeks) to confirm sero-
≥ 1:40	neg	Previous infection or re-infection possible	Monitoring of IgG antibodies, a significant increase in IgG without IgM antibodies indicates re-

Limitations / Cross reactions

1. ANA or AMA antibodies may lead to a fluorescence staining of all cells on the well. Some serum proteins may be stained by a non-immunological binding of fluorescent components.
2. MASTAFLUOR™ Measles has been demonstrated to be highly sensitive and specific, however, results should be considered along with all serological tests, clinical history and other aspects of patient management to be considered diagnostically significant.

Performance

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

	IgG	IgM
Sensitivity	95.8 %	42.8 %
Specificity	55.5 %	98.8 %

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

References

1. Gerike E., Tischer A., in: Diagnostische Bibliothek Vol 18, 1993, Blackwell Wissenschaftsverlag
2. Thomas L., Labor und Diagnose, 5. Auflage TH-Verlag, 1998
3. Fields, Virology, Third Edition, Lippencott-Raven, 1996

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

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