

RIDA[®] Aviditätsreagenz

Art. No.: LB0023



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Allgemeines

Für die *in vitro* Diagnostik. Das RIDA[®] Aviditätsreagenz ist ein Zusatzreagenz für die Bestimmung der Avidität von IgG-Antikörpern im RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG-Test.

2. Einleitung

Die klassische Infektionsserologie beruht auf der Beobachtung, dass erregerspezifische IgM-Antikörper nur vorübergehend gebildet werden, die entsprechende IgG-Antwort aber lange andauert. So ergibt sich aufgrund eines IgM-Befundes ein Hinweis auf eine akute Infektion, während ein IgG-Befund ohne paralleles IgM auf eine länger zurückliegende Infektion hindeutet. Aufgrund der Variabilität der Immunantwort und durch das Auftreten abweichender serologischer Verläufe (z.B. persistierende, reaktivierte oder fehlende IgM-Antwort) kann jedoch diese klassische Vorgehensweise in nicht wenigen Fällen zu Fehlschlüssen führen.

Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen. In der frühen Phase einer Infektion zeigen die IgG-Antikörper eine schwächere Bindung zum Antigen; stärker bindende Antikörper weisen auf eine bereits länger zurückliegende Infektion hin. Die Bestimmung der IgG-Avidität liefert als ergänzende Analyse zur klassischen Serologie Hinweise zur Datierung einer Infektion. Bei der Ausbildung der IgG-Antwort kommt es zu einer sukzessiven Zunahme der Avidität des gebildeten IgG für das entsprechende Antigen – ein äußerst regelmäßig auftretender immunologischer Prozess. Daher liegt bei einer akuten Infektion stets ein niedrig avides IgG, bei einer abgelaufenen Infektion ein hoch avides IgG vor. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in den letzten Jahren ein weiterer, sehr aussagekräftiger Marker in die Diagnostik eingeführt: die Avidität des IgG.

3. Testprinzip

Für die Testdurchführung werden je zwei Teststreifen mit der verdünnten Serumprobe parallel inkubiert. Während dieser ersten Inkubation binden Antikörper in der Probe an ihre auf dem Teststreifen fixierten spezifischen Antigene. Anschließend wird einer der beiden Teststreifen mit der Aviditätslösung gewaschen. Bei diesem Schritt diffundieren die niedrig aviden Antikörper ab, während hoch avide Antikörper an ihren spezifischen Antigenen gebunden bleiben. Nach dem Waschen werden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-human-Antikörper zugegeben. Die Sichtbarmachung der spezifischen, an ihre Antigene gebundenen Antikörper erfolgt nach erneutem Waschen durch Zugabe von einem Substrat, welches die Antigen-Antikörper-Komplexe durch das Auftreten von Banden auf

den Teststreifen sichtbar macht. Die relative Position der gefärbten Banden zeigt die Spezifität der reagierenden Antikörper an. Durch den abschließenden Vergleich der beiden entsprechenden Teststreifen lässt sich eine Aussage über die Avidität der Antikörper ermitteln, die wiederum eine Interpretation der Infektionsstadiums ermöglicht.

4. Packungsinhalt

Das Reagenz ist ausreichend für die Durchführung von 25 Bestimmungen. Jedes Testkit enthält eine Flasche mit:

Avidity	25 Best.	Aviditätsreagenz (Feststoff); für ca. 60 ml gebrauchsfertige Lösung
---	----------	--

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Das Aviditätsreagenz (Feststoff) ist im ungeöffneten Zustand gemäß den Angaben auf dem Etikett haltbar. Die Lagerung kann im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur erfolgen (2 - 25 °C). In Verbindung mit dem RIDA[®]LINE Parvovirus B19 Test ist die Haltbarkeit des LINE-Blots zu beachten. Das Aviditätsreagenz (Feststoff) muss vor Feuchtigkeit geschützt werden.

Die gebrauchsfertige Lösung kann im Kühlschrank bei 2 - 8 °C für 8 Wochen aufbewahrt werden. Eine Lagerung bei -20 °C ist für 12 Monate möglich. Die Aviditätslösung sollte dann in warmem Wasser aufgetaut werden (Dauer ca. 45 Minuten).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG (Art. Nr. LB6023)

6.2. Zubehör

- Messzylinder für 50 ml

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Beim Umgang mit dem Reagenz (Feststoff) ist die Verwendung eines Atemschutzes und eines Augenschutzes erforderlich, die Verwendung eines Hautschutzes wird empfohlen. Die gebrauchsfertige Lösung kann ohne Atemschutz verwendet werden. Die Lösung nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit Haut oder Schleimhaut vermeiden. Nach Kontakt muss das Reagenz mit reichlich Wasser aus- bzw. abgewaschen werden.

8. Herstellung der gebrauchsfertigen Aviditätslösung

Das bereits fertig abgewogene Aviditätsreagenz wird in 40 ml des gebrauchsfertigen Wasch- / Verdünnungspuffers aus dem RIDA[®]LINE Parvovirus B19 Testkit gelöst. Dieser Lösungsprozess nimmt einige Zeit in Anspruch und kann bei Bedarf durch leichtes Erwärmen beschleunigt werden. Die fertige Lösung hat ein Endvolumen von etwa 60 ml.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Testbeginn müssen alle Reagenzien (RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG und RIDA[®] Aviditätsreagenz) für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (18 - 25 °C) gebracht werden. Neben den hier gemachten Angaben gelten zusätzlich alle Hinweise in der Gebrauchsanweisung des RIDA[®]LINE Parvovirus B19 Testkits.

Es müssen von jeder Probe immer zwei Streifen parallel angesetzt werden. Um eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen, wird ein Streifen mit dem Aviditätsreagenz behandelt und der andere nicht. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

9.2. Erste Inkubation

Für jede Probe werden zwei Vertiefungen einer Inkubationswanne benötigt. In jede Vertiefung werden 2 ml des gebrauchsfertigen Wasch- / Verdünnungspuffers pipettiert. In den Puffer wird anschließend jeweils ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht.

Die Streifen müssen vollkommen mit Puffer benetzt sein. Die Streifennummerierung muss nach oben zeigen.

Je 20 µl der unverdünnten Proben (Serum oder Plasma) werden in zwei Vertiefungen gegeben (Verdünnung 1:101). Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Puffer zu pipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen. Während der Inkubation sollten die Wannen mit den beigegeführten Deckeln abgedeckt werden.

Die Blotstreifen werden mit der Probe unter leichtem Schütteln 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) inkubiert.

9.3. Waschen

Die Inkubationslösung wird aus den Vertiefungen abgesaugt, vorzugsweise mit einer Absaugpumpe mit angeschlossener Desinfektionsfalle. In jede Vertiefung werden anschließend 2 ml des gebrauchsfertigen Wasch- / Verdünnungspuffers gegeben. Die Streifen werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Puffer abgesaugt.

9.4. Zweite Inkubation

Zu jeweils einem Streifen des Doppelansatzes werden 2 ml Wasch- / Verdünnungspuffer und zum anderen 2 ml der gebrauchsfertigen Aviditätslösung gegeben. Die Streifen werden **3 Minuten** bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) inkubiert. Bei diesem Schritt werden die niedrig-aviden Antikörper „abgewaschen“. Der zweite Ansatz, der nicht mit dem Aviditätsreagenz behandelt wird, muss bei jeder Probe mitgeführt werden.

Achtung!

Es ist zwingend erforderlich die Zeitspanne von drei Minuten genau einzuhalten.

9.5. Waschen

Die Inkubationslösung wird aus den Vertiefungen abgesaugt, vorzugsweise mit einer Absaugpumpe mit angeschlossener Desinfektionsfalle. In jede Vertiefung werden anschließend 2 ml des gebrauchsfertigen Wasch- / Verdünnungspuffers gegeben. Die Streifen werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Puffer abgesaugt.

9.6. Dritte Inkubation

Zu jedem Streifen werden 2 ml der frisch angesetzten IgG-Konjugatlösung pipettiert. Danach werden die Wannen abgedeckt und 45 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) inkubiert .

9.7. Waschen

Die Inkubationslösung wird aus den Vertiefungen abgesaugt, vorzugsweise mit einer Absaugpumpe mit angeschlossener Desinfektionsfalle. In jede Vertiefung werden anschließend 2 ml des gebrauchsfertigen Wasch- / Verdünnungspuffers gegeben. Die Streifen werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Puffer abgesaugt. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal durchgeführt.

9.8. Vierte Inkubation

Zu jedem Streifen werden 1,5 ml des gebrauchsfertigen Substrats pipettiert. Die Streifen werden 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) unter leichtem Schütteln inkubiert. Sobald die Cut off-Kontrollbande zu sehen ist, wird der Färbeprozess beendet. Das Substrat wird abgesaugt. Zum Stoppen der Färbereaktion werden die Streifen in den Wannen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser abgespült.

Die Streifen werden vorsichtig mit einer Pinzette den Wannen entnommen und zum Trocknen ca. 2 Stunden zwischen saugfähiges Papier gelegt. Nach dem Trocknen können die Streifen auf dem Auswertebogen aufgeklebt und anschließend ausgewertet werden.

10. Auswertung

Vergleichen Sie die Intensitäten der entsprechenden Banden auf den beiden Teststreifen, die mit dem gleichen Serum inkubiert wurden. Achten Sie darauf, ob sich die Intensitäten verändert haben.

Die Bewertung der Aviditätsstreifen wird anhand der Kriterien in der Gebrauchsanweisung des RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG durchgeführt.

Ein Antikörper wird als niedrig avide bezeichnet, wenn die Intensität der dazugehörige Bande bei der Aviditätsbestimmung um mindestens 50% abnimmt. Eine komplette Abnahme der Intensitäten ist ein relativ sicherer Hinweis auf eine frische Infektion.

Generell gilt, dass für die Aviditätsbeurteilung keine absoluten Regeln aufgestellt werden können. Die Interpretation der Avidität muss immer im Zusammenhang mit den gesamten Untersuchungsergebnissen erfolgen.

11. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Es wird darauf hingewiesen, dass Abweichungen von der vorgeschriebenen Testprozedur zu Fehlbeurteilungen führen können. Die vorgeschriebenen Inkubationszeiten sind unbedingt einzuhalten.

Alle Testergebnisse sollten als Ergänzung zum klinischen Bild betrachtet werden. Zur Festlegung der Diagnose sind in jedem Fall auch die klinischen Befunde und die zugehörige Anamnese mit einzubeziehen.