

MASTAFLUOR™ VZV

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-/ IgM-Antikörpern gegen
Varicella zoster in humanem Serum und Plasma

Immunofluorescence assay for the detection of IgG / IgM antibodies to
Varicella zoster in human serum and plasma

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



Deutsch: Seiten 02–04



English: Pages 05–07

MASTAFLUOR™ VZV IgG	REF 636332	10 x 5 Tests
MASTAFLUOR™ VZV IgG	REF 636334	10 x 10 Tests
MASTAFLUOR™ VZV IgM	REF 636331	10 x 5 Tests
MASTAFLUOR™ VZV IgM	REF 636333	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-diagnostics.de
E-Mail: mast@mast-diagnostics.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 France
Phone: + 33 3 22808067
Fax: + 33 3 22809922
Web: www.mastgrp.com
Email: service-commercial@mast-diagnostic.fr

Einführung

Varicella (Windpocken) ist eine akute virale Erkrankung überwiegend Heranwachsender, die durch das Varizella-Zoster-Virus, eines zur Herpes-Familie gehörenden Virus, verursacht wird. Die Erkrankung beginnt mit Fieber, Gliederschmerzen und der Bildung vereinzelter Roseolen, die innerhalb von 24 Stunden über Papeln zu Bläschen werden. Die Bläschen trocknen nach 3–4 Tagen ab und verheilen innerhalb von 3 Wochen. Die Infektion verläuft meist gutartig. Komplikationen und vereinzelt auch Todesfälle werden bei Erwachsenen meist durch eine primäre virale Pneumonie verursacht, bei Kindern kann es durch bakterielle Folgeinfektionen (Superinfektionen der Bläschen) oder Störungen des zentralen Nervensystems zu Komplikationen kommen.

Gefährlich sind die perinatalen Windpocken, die bei infizierten 5–10 Tage alten Neugeborenen zu einer Mortalität von bis zu 30 % führen können.

Die primäre VZV-Infektion führt zur Entstehung von Immunglobulinen der Klassen IgG, IgA und IgM, die sich an verschiedene virale Proteine binden. Die viruspezifische zelluläre Immunität ist entscheidend für die Eindämmung der Virusreplikation. Wie andere Herpesviren entwickelt auch das Varizella-Zoster Virus eine Latenzphase. Durch Nachlassen der Immunreaktivität entwickelt sich bei VZV-Reaktivierung oder Reinfektion ein schmerzhafter Zoster (Gürtelrose), meist als einseitiger, auf das Versorgungsgebiet eines Spinalnervs beschränkter bläschenförmiger Ausschlag.

Reinfektion bzw. Reaktivierung sind durch einen Anstieg des IgG-Antikörper Titers charakterisiert, während IgM-Antikörper nur vereinzelt detektierbar sind.

Verwendungszweck

Der MASTAFLUOR™ VZV ist ein Immunfluoreszenztest zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Varicella zoster Virus.

Testprinzip

Das verdünnte Probenmaterial (Serum, Plasma) wird zusammen mit den erforderlichen Kontrollen auf die Testfelder des Objektträgers pipettiert. Die Testfelder sind mit MRC-5 human embryonalen Lungenfibroblasten beschichtet, die mit dem Varicella zoster Virus 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 Waschschriff 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 Waschschriff entfernt. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Testfelder ausgewertet. Liegen Antikörper gegen VZV im Serum vor, fluoresziert das Cytoplasma und / oder der Kern infizierter Zellen.

Packungsinhalt

Inhalt	100 Tests	50 Tests	Spezifikation
Objektträger	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Beschichtet mit VZV-infizierten MRC-5-Zellen (humane embryonale Lungenfibroblasten)
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
Eindeckmedium	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™ VZV 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 Einmalpipettenspitzen 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 Humansenen, 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. Hämolytische oder lipämische Seren können bei 56 °C inaktiviert werden.
17. 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 nachspülen.

Testdurchführung

1. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
2. 1 Sacht 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 Waschschrift 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 Waschschrift 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 abzuspielen.

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 eine grüne Fluoreszenz des Cytoplasmas und / oder des Kern infizierter Zellen.

IgG-negative Proben zeigen keine oder nur eine mattgrüne Fluoreszenz.

IgM-positive Proben zeigen eine schwache grüne Fluoreszenz cytoplasmatischer Einschlüssen und eine stärkere diffuse cytoplasmatische Fluoreszenz infizierten Zellen. Eine diffuse Fluoreszenz im Cytoplasma nicht-infizierter Zellen ist möglich. Die Fluoreszenzstärke ist abhängig von der IgM-Antikörperkonzentration.

IgM-negative Proben zeigen keine Fluoreszenz.

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.

Diagnostische Bedeutung

Nach einer Primärinfektion mit Varicella zoster bilden sich innerhalb von 3–6 Tagen IgG- und IgM-Antikörper. IgM-Antikörper bleiben ca. 6 Wochen bestehen, während IgG-Antikörper lebenslang in niedrigen Titern persistieren. Eine Reinfektion mit Windpocken ist daher selten.

Beim Herpes zoster kommt es innerhalb weniger Tage zum IgG- und IgA-Antikörperanstieg, in 35 % der Fälle ist auch der Nachweis von IgM-Antikörpern möglich.

Grenzen des Nachweisverfahrens / Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern anderer Viren der Herpesgruppe (HSV-1, HSV-2, EBV, und CMV) können nicht ausgeschlossen werden. In ca. 20 % der positiven Ergebnisse kommt es zu einer der o. g. Antikörper bedingten Kreuzreaktionen. Bei positiven oder grenzwertigen Fällen sollte daher mit anderen Methoden eine Kreuzreaktion ausgeschlossen werden.

Leistungsdaten

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

	IgG	IgM
Sensitivität	97,9 %	75 %
Spezifität	33,3 %	100 %

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

Literatur

1. Arvin, AM. Varicella-zoster virus. Clin. Microbiol. Rev., 9(3): 361 - 81 (1996).
2. Dufour, P. et al. Varicella and pregnancy. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 66(2): 119 - 23 (1996).
3. May, G, May, W. Detection of serum IgA antibodies to varicella zoster virus (VZV) differential etiology of peripheral facial paralysis. Laryngorhinootologie, 74(9): 553 - 4 (1995).
4. Yawn, BP. et al. Community impact of childhood varicella infections. J. Pediatr., 130(5): 759 - 65 (1997).
5. Thomas, L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 1998

Introduction

Varicella is an acute viral disease caused by the varicella-zoster virus (VZV) that belongs to the herpes virus family.

The disease begins with fever and malaise and a maculopapular rash that changes within hours to vesicles that remain during 3 to 4 days. Lesions pustulate, crust and heal slowly over a 3 week period. Lesions appear in the scalp, face, neck, trunk, mucous membranes of the mouth and upper respiratory tract. Sometimes, especially in adults, the fever and general clinical status can be severe but the disease is rarely fatal. The most common cause of death in adults is the primary viral pneumonia and in children secondary bacterial infections or central nervous system involvement. Children with acute leukemia or immunocompromised persons are at higher risk of a general dissemination of the disease with fatal outcome. Newborns that are infected after 5 to 10 days and the ones born from mothers that were infected 5 days before or two days after birth can develop severe generalised Varicella with a mortality rate of 30 %. Infection at the beginning of pregnancy rarely gives congenital malformations.

Reactivation of VZV is usually manifested as zoster. Zoster normally begins with unilateral sharp and well localised pain. In this case the titer of the IgG antibodies is increased, whereas the titer of IgM antibodies is raised only in some few cases.

Intended Use

MASTAFLUOR™ VZV provide an indirect immunofluorescence test system for the detection of specific antibodies to Mumps virus antigen.

Test Principle

IFA slides are coated with MRC-5 human embryonal lung fibroblasts infected with varicella-zoster 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 and / or nuclear fluorescence in infected cells.

Kit Contents

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

Content	100 Tests	50 Tests	Specifications
Slides	10 x 10 Wells	10 x 5 Wells	Coated with VZV infected MRC-5 human embryonal lung fibroblasts
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

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™ VZV 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 °C for up to 30 days.

Serum and plasma specimens may be stored at 2–8 °C for up to 48 hours prior to use or for longer storage at -20 °C. 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. Re-usable 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.
16. In the event that haemolysed or lipemic serum must be used, heat inactive at 56 °C before use.
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 °C) 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 absorbent (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 one at a time 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 min (same incubation for IgG and IgM).
13. Switch on microscope 15 min 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 show a green cytoplasmic and / or nuclear fluorescence in infected cells.

IgG negative specimens show no green fluorescence; a green staining without fluorescence may be visible.

IgM positive specimens show a fluorescence of cytoplasmic inclusions and a more intense fluorescence of 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.

Limitations / Cross reactions

1. Varicella-zoster virus and viruses of the herpes virus group (HSV-1, HSV-2, EBV and CMV) do show antigen homologies. So antibody cross-reactions may be found among those viruses. Positive and borderline results should therefore be re-tested with another test to confirm the very result.
2. Borderline results should be re-tested with a fresh collected serum or plasma sample.

MASTAFLUOR™ VZV 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.

Diagnostic Relevance

Specific IgG and IgM antibodies are found within 3 to 6 days after a primary infection with varicella-zoster virus. IgM antibodies can be detected for about 6 weeks, whereas IgG antibodies may persist at low titers for the rest of the life. So a reinfection with Varicella zoster is found rather rarely.

In case of herpes zoster a rise in IgG and IgM antibody titers is detectable within a few days. IgM antibody titers are found in about 35 % of all case.

Performance

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

	IgG	IgM
Sensitivity	97.9 %	75 %
Specificity	33.3 %	100 %

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

References

1. Arvin, AM. Varicella-zoster virus. Clin. Microbiol. Rev., 9(3): 361 - 81 (1996).
2. Dufour, P. et al. Varicella and pregnancy. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 66(2): 119 - 23 (1996).
3. May, G, May, W. Detection of serum IgA antibodies to varicella zoster virus (VZV) differential etiology of peripheral facial paralysis. Laryngorhinotologie, 74(9): 553 - 4 (1995).
4. Yawn, BP. et al. Community impact of childhood varicella infections. J. Pediatr., 130(5): 759 - 65 (1997).
5. Thomas, L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 1998

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

SLIDES	Objekträger	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