



ENZYWELL

MEASLES IgG

REF 91072 (48 tests)

REF 91080 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Hersteller/ Κατασκευάζεται
από/ Fabricado por/ Fabriqué par:
DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX / INHALT/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE / CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / VERWENDUNGSZWECK/ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / PHYSIOLOGIE/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / TESTPRINZIP/ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE /
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN / ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN/ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ART UND LAGERUNG DER PROBEN / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / TESTDURCHFÜHRUNG / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / TESTSCHEMA /ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / TESTVALIDIERUNG / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE /
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / GRENZEN DES VERFAHRENS / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ANALYTISCHE SPEZIFITÄT /ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT /ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRÄZISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / “TROUBLE SHOOTING” / “TROUBLE SHOOTING” (PROBLEMLÖSUNGEN) /ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / LITERATUR / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL MEASLES IgG

REF 91072 (48 tests) **REF 91080 (96 tests)**

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI VIRUS DEL MORBILLO NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DAL VIRUS DEL MORBILLO.

2. INTRODUZIONE

L'infezione causata dal virus del morbillo è stata debellata negli ultimi anni, grazie ai programmi di vaccinazione dei bambini. Tuttavia, nei casi in cui la vaccinazione non ha dato buon esito e nei soggetti non vaccinati, si è notata una tendenza all'infezione fra giovani adulti. Il morbillo, un paramixovirus, causa una infezione respiratoria altamente contagiosa che può portare a delle gravi conseguenze, particolarmente negli adulti. Lo screening di donne in gravidanza, di giovani adulti e di altri gruppi a rischio, può quindi costituire un mezzo valido nel determinare lo stato immune.

3.- PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigene da Virus del morbillo 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 48 determinazioni (REF 91072)
- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni (REF 91080)

Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE MICROPIASTRA 6 x 8 pozzetti sensibilizzati con Virus del Morbillo (REF 91072)
MICROPIASTRA 12 x 8 pozzetti (REF 91080)

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (MG 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.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

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

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT OFF 1 x 2 mL

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

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 10 mL (REF 91072); 1 x 16 mL (REF 91080)

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

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 2 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) 1 x 12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 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, 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
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione

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
CONTROLLI	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; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

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.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

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 calibratori contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.

3. Le apparecchiature non dispositive 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 CO₂.
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'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'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 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, può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. Evitare di inattivare il campione al calore. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei. Campioni fortemente lipemici, itterici, emolizzati o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 ml + 900 mL H₂O).

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 controlli NON DILUITI (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo. 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 a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

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

Togliere il valore del bianco (≤ 0.150) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio se testato in triplicato. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere ≤ 0.6 . La D.O. del Cut-off deve essere ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

1. Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgG specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-Off. Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ del Cut-Off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

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

2. Risultati quantitativi

Unità Arbitrarie (AU)

I risultati positivi possono essere espressi in unità arbitrarie con questa semplice operazione:

$$AU = \frac{\text{O.D. campione}}{\text{O.D. Cut-Off}}$$

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-Morbillo dovrebbe essere determinato usando il kit Enzywell Measles IgM. 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.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

La presenza di anticorpi IgG contro virus quali Epstein Barr, Herpes Simplex, Parotite non altera il risultato del test.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione presso un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 85 campioni di siero, in confronto con un altro kit immunoenzimatico in commercio. I campioni in disaccordo venivano analizzati con l'immunofluorescenza come metodo di riferimento.

I risultati possono essere così riassunti:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	56	0
	-	2	27

La sensibilità del metodo in esame è del 96,6%, mentre la specificità è del 100%.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi:

<i>Cut-off n=12</i>	<i>Lotto 027</i>	<i>Lotto 028</i>	<i>Lotto 029</i>
<i>D.O.</i>	0.38	0.57	0.47
<i>CV%</i>	3	6	3

Precisione tra sedute e tra lotti:

<i>Campione</i>	<i>INDEX</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lotto 027</i>	<i>Lotto 028</i>	<i>Lotto 029</i>		
<i>1</i>	0.4	0.5	0.7	0.5	28
<i>2</i>	1.4	1.2	1.5	1.4	13
<i>3</i>	3.6	2.8	4.2	3.5	20

16. GUIDA AI 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 IFU punto 4).
		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	Lavaggio incompleto 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. D. Erdman et al. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
2. D. Erdman et al. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL MEASLES IgG

REF 91072 (48 tests) **REF 91080 (96 tests)**

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO MEASLES VIRUS IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF MEASLES VIRUS INFECTION.

2. INTRODUCTION

Measles has been largely eliminated in recent years as a major childhood disease thanks to immunisation campaigns. However, as a result of vaccination failure or subjects who have not been vaccinated, there has been a shifting tendency for young adults to become infected. Measles, a paramyxovirus, causes a very contagious respiratory infection which can have severe consequences, particularly in adults. The screening of pregnant women, young adults and other high risk patients for circulating antibodies is important in determining the immune status.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

The purified and inactivated measles 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 48 determinations (REF 91072)

- Reagents are sufficient for 96 determinations (REF 91080)

Bring reagents to room temperature before use.

MT PLATE STRIPS COATED WITH MEASLES VIRUS 6x8 wells (REF 91072)

STRIPS COATED WITH MEASLES VIRUS 12x8 wells (REF 91080)

Use: open the package at the opposite end from the code (MG, followed by the lot number) which is useful for identification purposes; 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.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-Measles IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL 1 x 2 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-Measles IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONJ CONJUGATE 1x10 mL (REF 91072); 1x16 mL (REF 91080)

Contents: anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution. Ready for use without further dilution.

Stability: The product is stable up to the expiry date when stored at 2-8°C.

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

Contents: Human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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 2 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 1 x 12 mL Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide stabilised in citrate buffer, pH 3.8.

H₂SO₄ 0.3 S TOP SOLUTION 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 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 (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µL solution
- 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
Controls	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.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

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.

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. CO₂ 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. Use of the kit with automatic 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. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully mixed before performing the test. Avoid heat inactivation of the sample. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.

- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 ml + 900 mL H₂O).

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 controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control. 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 the 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 at 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample//Controls in the wells of the strips.

Incubate for 45 min. at 37°C

Wash 4 times (30" soak time; 300 µL)

STEP 2 Add 100 µL of conjugate to each well

Incubate for 45 min. at 37°C

Wash 4 times (30" soak time; 300 µL)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The OD value of the cut-off Control must be within 25% of the average value if tested in triplicate. Discard any anomalous values and recalculate the average. The Positive Control must have an OD of at least 1.5 times the cut-off value. The ratio between Negative Control and cut-off must be ≤ 0.6 . The O.D. of the Cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

1. Qualitative results

If the OD of the sample is higher than the cut-off the sample is positive for the presence of specific IgG. Calculate the ratio between the OD of the sample and that of the cut-off. The sample will be considered:

Positive: when the ratio is > 1.2

Doubtful: $\pm 20\%$ of the cut-off

Negative: when the ratio is < 0.8 .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, take a new blood sample.

2. Quantitative results

Arbitrary Units (AU)

Positive results can be expressed in arbitrary units with the following formula:

$$AU = \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{Cut-Off}}}$$

OD Cut-Off

Generally this ratio is considered an "index" value of positivity.

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 Measles IgM level should be determined using the Enzywell Measles IgM kit. 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.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

The presence of IgG antibodies against viruses such as Epstein Barr, Herpes Simplex, Mumps does not alter the result of the test.

14. DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 85 samples were analysed, in comparison with another commercial immunoenzymatic method. Those samples which were in disagreement between the two methods were tested by IFA, taken as reference method.

The results can be summarised as follows:

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	56	0
	-	2	27

The sensitivity of the method is 96,6%, while the specificity is 100%.

15. PRECISION

“In run” precision on three different batches

<i>Cut-off n=12</i>	<i>Lot 027</i>	<i>Lot 028</i>	<i>Lot 029</i>
<i>O.D.</i>	0.38	0.57	0.47
<i>CV%</i>	3	6	3

Precision between runs and between lots

	INDEX				
<i>Sample</i>	<i>Lot 027</i>	<i>Lot 028</i>	<i>Lot 029</i>	<i>Average</i>	<i>CV%</i>
<i>1</i>	0.4	0.5	0.7	0.5	28
<i>2</i>	1.4	1.2	1.5	1.4	13
<i>3</i>	3.6	2.8	4.2	3.5	20

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 section 4 of the IFU 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. D. Erdman et al. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
2. D. Erdman et al. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).



GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZYWELL MEASLES IgG

REF 91072(48 Bestimmungen)**REF 91080(96 Bestimmungen)****(Deutsch)****1. VERWENDUNGSZWECK**

Measles IgG ist eine immunenzymatische Methode zur qualitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Masernvirus in humanem Serum.

2. PHYSIOLOGIE

Durch Impfkampagnen wurden Masern in den letzten Jahren weitgehend als bedeutende Kinderkrankheit eliminiert. Als Folge mangelnder oder ausgelassener Impfungen infizieren sich heute jedoch zunehmend junge Erwachsene. Das Masernvirus, ein Paramyxovirus, löst eine sehr ansteckende Infektion aus, die vor allem bei Erwachsenen schwere Folgen haben kann. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Immunstatus zu bestimmen und schwangere Frauen, junge Erwachsene und andere Risikopatienten im Hinblick auf zirkulierende Antikörper zu untersuchen.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Gereinigtes und inaktiviertes Masernvirus-Antigen ist an eine Festphase (Streifen mit je 8 Wells) gebunden. Die spezifischen Immunglobuline werden bei der Inkubation mit verdünntem Patientenserum an das Antigen gebunden.

Die ungebundenen Proteine, die nicht reagiert haben, werden aus den Wells gewaschen; danach folgt eine Inkubation mit dem Konjugat aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes IgG, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt sind.

Das ungebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidase-Substrat zugegeben.

Die Farbe, die sich entwickelt, ist proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern, die in der Probe vorhanden sind.

4. KITKOMPONENTEN

Die Reagenzien sind ausreichend für 48 Bestimmungen (REF 91072)

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen (REF 91080)

Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

MT PLATE MIKROTITERPLATTE Streifen, beschichtet mit inaktivierten und gereinigten Masern-Antigenen. 6x8 Wells (REF 91072); 12 x 8 Wells (REF 91080)

Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (MG plus Lotnummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beigefügten Plastikbeutel mit dem Silica-Gel lagern; die Luft herausdrücken und gut verschließen.

CONJ KONJUGAT 1x10 mL (REF 91072) ; 1 x 16 mL (REF 91080)

Inhalt: Monoklonale Antikörper gegen humanes IgG, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, in Phosphatpuffer. Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

Stabilität: Das Produkt ist bis zum Verfallsdatum stabil, wenn es bei 2-8 °C gelagert wird.

CONTROL + POSITIVKONTROLLSERUM 1 x 1.6 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannter Anti-Masern-IgG-Konzentration in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

Farbe: Die Farbintensität der Kalibratoren ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF KONTROLLSERUM 1 x 2 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannter Anti-Masern-IgG-Konzentration in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

Farbe: Die Farbintensität der Kalibratoren ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL IgG - NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1.6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Humanserum in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, stabilisiert in Zitratpuffer, pH 3,8. Gebrauchsfertig.

SAMP DIL 2 VERDÜNNUNGSMITTEL 2 (PF93611) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 0,09 % Natriumazid und Methylorange.

WASH BUF 10x WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0,5 % Brij.

Rekonstitution: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

H₂SO₄ 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: H₂SO₄ 0,3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

ABDECKFILM (2).

POLYEHTYLENBEUTEL (1).

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Inkubator bei 37 °C
- Mikrotiterplatten Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis mindestens 2000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispenservolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 µl
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorit-Lösung (5 %)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8 °C gelagert werden.

Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.

REAGENZ	KONDITIONEN
MIKROTITERPLATTE	6 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel
KONTROLLSERUM	6 Wochen bei 2-8 °C
KONJUGAT	6 Wochen bei 2-8 °C
SUBSTRAT	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C, 1 Woche bei 15-30 °C im Dunkeln
VERDÜNNUNGSMITTEL	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C
WASCHPUFFER	2 Wochen bei 2-8 °C, 5 Tage bei 15-30 °C
STOPPLÖSUNG	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**SICHERHEITSHINWEISE****NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.**

Achtung: Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, die mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ waren. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Erreger enthalten, sollten alle Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serum-Proben und die verwendeten Reagenzien müssen als infizierte Abfälle behandelt werden, das heißt, im Einklang mit den geltenden Vorschriften entsorgt werden.

- Gesundheits- und Sicherheitsinformationen

Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.

- Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:
 - e) Der Waschpuffer enthält Detergenzien.
 - f) Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol.
 - g) Das Substrat ist eine Säure.
 - h) Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden. Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.
- Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121 °C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.
- Schwefelsäure (Stop Solution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.
- Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorit mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorit (1 %) ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.
- Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorit (1 %) nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorit sollte nicht bei verschütteter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- **Lagerung bei 2-8 °C**
- Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30 °C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat nicht unterhalb 35 ° und nicht über 39 °C anzeigt.**
- Öffnen Sie die Packung mit den Streifen erst nach 30 Minuten bei Raumtemperatur.
- Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Haltbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
- Die Testdurchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
- Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
- Vermeiden Sie Gefrierschränke mit Abtauautomatik für die Lagerung von Proben.
- Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorit-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
- Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
- Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
- Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
- Enzymimmunoassays können gelegentlich einen "Edge-Effect" zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO₂ Inkubatoren.
- Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.
- Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.
- Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigt werden
- Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
 - Installation und besondere Bedarfsartikel
 - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
 - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
 - Service und Wartung

7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

- Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Hitzeinaktivierung der Probe vermeiden. Die Qualität einer Probe kann durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden. Sie führt zu falschen Ergebnissen.
- Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden.
- **Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!**

8. TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor.
- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Washing Buffer 1:10 mit destilliertem Wasser (Beispiel 100 ml + 900 ml H₂O).

PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Lassen Sie die erste Well (A1) für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat und 100 µl Stopplösung pipettieren). 100 µl unverdünnte Positiv-, Negativkontrolle und unverdünntes Cut-Off-Serum in die entsprechenden Wells pipettieren. (Das Minimum sind 1 Negativkontrolle, 2 Cut-Off und 1 Positivkontrolle.) Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells (Doppelbestimmungen werden empfohlen).

Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal waschen (300 µl, mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Meerrettichperoxidase-Konjugat in die Wells pipettieren (außer Substratleerwert). Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. Erneut 4-mal wie oben beschrieben waschen. Schließlich 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (einschließlich der ersten Well für den Substratleerwert).

15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).

Die Extinktion innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm messen.

9. TESTSCHEMA

Die erste Well für den Substratleerwert frei lassen.

- 100 µl unverdünnte Negativkontrolle, Cut-Off und Positivkontrolle in die entsprechenden Wells pipettieren.
- In die Wells 100 µl der verdünnten Proben pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl, mit 30 Sekunden Einwirkzeit).
- Zu allen Wells außer Well A1 100 µl Konjugat zufügen.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl, mit 30 Sekunden Einwirkzeit).
- 100 µl Substrat in alle Wells (einschließlich Well A1) pipettieren.
- 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- 100 µl Stopplösung hinzufügen (einschließlich zu Well A1).
- Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten. Bei Readern mit 2 Wellenlängen stellen Sie den Referenzfilter auf 600-650 nm ein.

10. VALIDITÄT DES TESTS

Die OD des Substratleerwerts muss $\leq 0,150$ sein. Subtrahieren Sie den Substratleerwert von allen Extinktionen. Die Extinktion der Einzelwerte des Cut-Off-Serums muss bei einer Dreifachbestimmung innerhalb von 25 % des Extinktionsmittelwertes liegen. Abweichende Werte werden ggf. eliminiert, und der Mittelwert wird anschließend neu berechnet. Die Extinktion der Positivkontrolle muss mindestens das 1,5fache der Extinktion des Cut-Off-Serums betragen, die Extinktion der Negativkontrolle muss $\leq 0,6$ fache des Cut-Off-Serums betragen. Die OD des Cut-Off muss $\geq 0,2$ bei 450 nm und $\geq 0,16$ bei 450/620 nm sein.

11. QUALITATIVE ERGEBNISSE

Subtrahieren Sie die Blank ODs von allen übrigen Messungen. Berechnen Sie die Ratio zwischen dem Extinktionswert der Probe und dem des Cut-Off. Die Ratio ist der Cut-Off-Index (COI).

$$\text{COI} = \text{OD Probe} / \text{OD Cut-Off}$$

Die Probe ist:

positiv: wenn der COI $> 1,2$ ist,

zweifelhaft: wenn der COI zwischen 0,8 und 1,2 (Cut-Off $\pm 20\%$) ist,

negativ: wenn der COI < 0,8.

Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Eine Serumprobe, die in der akuten Phase einer Infektion entnommen wurde, wenn nur IgM-Antikörper vorhanden sind, kann in diesem Test negativ ausfallen.

Die Masern-IgM-Werte sollten mit dem Measles IgM Kit bestimmt werden. Alternativ können Sie auch nach 8-14 Tagen erneut IgG bestimmen, um einen Anstieg zu überprüfen.

Zur Erstellung der Diagnose sollte das Testergebnis immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen Epstein Barr, Herpes simplex und Mumps hat keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer Studie in einem Krankenhauslabor wurden 85 Proben getestet und mit einem anderen kommerziellen Enzymimmunoassay verglichen. Die Proben, die bei den zwei Methoden nicht übereinstimmten, wurden mit IFA als Referenzmethode getestet.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

		REFERENZ	
		Positiv	Negativ
Diesse	Positiv	56	0
	Negativ	2	27

Die relative Sensitivität der Methode beträgt 96,6%, die relative Spezifität 100 %.

15. PRÄZISION

Präzision in der Serie mit drei verschiedenen Lots

<i>Cut-Off n=12</i>	<i>Lot 027</i>	<i>Lot 028</i>	<i>Lot 029</i>
<i>O.D.</i>	0,38	0,57	0,47
<i>CV%</i>	3	6	3

Interassay- und Lot-zu-Lot-Präzision

	CUT-OFF-INDEX				
<i>Probe</i>	<i>Lot 027</i>	<i>Lot 028</i>	<i>Lot 029</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>CV%</i>
<i>1</i>	0,4	0,5	0,7	0,5	28
<i>2</i>	1,4	1,2	1,5	1,4	13
<i>3</i>	3,6	2,8	4,2	3,5	20

16. "TROUBLESHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

Wenn Sie sowohl die Angaben in der Gebrauchsanweisung für die Testdurchführung und deren Spezifikationen beachten als auch sorgfältig mit den Reagenzien umgehen und pipettieren, können Sie die folgenden Fehler vermeiden.

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHE	MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG
Ungültiger Testrun (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.

Ungültiger Testrun (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.
	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschrift. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäßige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

17. LITERATUR

3. D. Erdman et al. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
4. D. Erdman et al. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL
IgG ΙΛΑΡΑΣ
REF 91072 (48 tests) **REF 91080 (96 tests)**

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ
ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΙΛΑΡΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λοίμωξη που προκαλείται από τον ιό της ιλαράς, εξαλείφθηκε τα τελευταία χρόνια, χάρη στο πρόγραμμα εμβολιασμού των παιδιών. Παρ' όλα αυτά, στις περιπτώσεις που ο εμβολιασμός δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς και στα άτομα που δεν είχαν εμβολιαστεί, παρατηρήθηκε μία τάση των νεαρών ενηλίκων να προσβάλλονται από τον ιό. Η ιλαρά, ένας παραμυξοϊός, προκαλεί μία αναπνευστική λοίμωξη πολύ μεταδοτική που μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις, ειδικά στους ενήλικες. Η εργαστηριακή παρακολούθηση των εγκύων, των νεαρών ενηλίκων και άλλων ομάδων υψηλού κινδύνου, είναι ένα αποτελεσματικό μέσο προσδιορισμού της ανοσολογικής κατάστασής τους.

3.- ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Το αντιγόνο από ιό Ιλαράς, κεκαθαρισμένο και αδρανοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση (ταινίες με κυψελίδες 1x8). Οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό. Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα IgG σεσημασμένα με υπεροξειδάση.

Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης.

Το χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 48 τεστ (REF 91072)
- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ (REF 91080)

Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.

MT PLATE

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ. 6 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με τον Ιό της Ιλαράς (REF 91072)

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με τον Ιό της Ιλαράς (REF 91080)

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (MG ακολουθούμενα από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε τη βάση και τις απαραίτητες ταινίες. Βάλτε και πάλι πίσω στη σακούλα από πολυαιθυλένιο, που περιέχει γέλη πυριτίας τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

CONTROL +

ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgG κατά της Ιλαράς, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONTROL CUT-OFF

ΕΛΕΓΧΟΣ CUT-OFF 1 x 2 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgG κατά της Ιλαράς, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONJ

ΣΥΖΥΓΕΣ 1 x 10 mL (REF 91072) ; 1x 16 mL (REF 91080)

Περιεχόμενο: διάλυμα ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-IgG σεσημασμένων με υπεροξειδάση. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

CONTROL IgG -

ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgG (PF93910) 1 x 1.6 mL

ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

WASH BUF 10x ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραιώση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες,, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1 x 12 mL Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H₂O₂ 0,01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H₂SO₄ 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).

ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.

- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. >= 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 µL
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10, 100, 1000 µL διαλύματος

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C.

Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε σετ και στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια σταθερότητας μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ	6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο
ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ	6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ στους 2/8°C
ΣΥΖΥΓΕΣ	6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ στους 2/8°C
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C
ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ	έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C
ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C

Προσοχή:

Αυτή η συσκευασία περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από ελέγχους και έχουν βρεθεί αρνητικά, σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντισώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού και ο αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

7. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά από κάθε ανάλυση.
8. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
 - α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
 - β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
 - γ) το υπόστρωμα είναι όξινο
 - δ) Οι βαθμονομητές περιέχουν Αζίδιο Νατρίου (0,09%) το οποίο μαζί με τον χαλκό και τον μόλυβδο μπορεί να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων.
 Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
9. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης, πρέπει να αποστειρώνονται, κατά προτίμηση στον κλίβανο, για 1 h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θειικό οξύ, που περιέχεται στο Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα του υάλινου εξοπλισμού, είναι διαβρωτικά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
11. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες, είναι αρκετή για να γίνει μία αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η επιφάνεια να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την διαδικασία ανάλυσης. Αν τα υγρά περιείχαν ένα οξύ, τότε στεγνώστε πολύ καλά την επιφάνεια πριν χρησιμοποιήσετε το υποχλωριώδες νάτριο. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χέιλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO₂.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
 - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς των εργαστηρίων. Ο νωπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4

ημέρες στους 2/8°C, ενώ για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξετε στους -20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη και πριν να το ρίξετε στην κυψελίδα, ανακινήστε το καλά.. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος, και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες

- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H₂O)

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 μL ορού σε 1 mL διαλύτη και ρίξτε 100 μL κάθε αραιωμένου δείγματος σε κάθε κυψελίδα (σας συμβουλεύουμε να κάνετε την ανάλυση εις διπλούν). Σε μία ταινία ρίξτε τους ορούς ελέγχου ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΡΑΙΩΣΕΤΕ (100 μL ανά κυψελίδα). Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 1 ορός ελέγχου αρνητικός, 2 cut-off και 1 θετικός. Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού δείγματος, χρησιμοποιώντας μόνο 100 μL υποστρώματος.

Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διάρκειας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 μl) προσθέστε 100 μL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C καλύπτοντάς τις και πάλι με την προστατευτική ταινία.. Ξεπλύνετε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 μL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 μL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά..

9. Διάγραμμα της ανάλυσης

STEP 1 Ρίξτε 100 μL αραιωμένου ορού/ορών ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας.

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl)

STEP 2 Ρίξτε 100 μL συζυγούς ανά κυψελίδα

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl)

STEP 3 Ρίξτε 100 μL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα

Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

STEP 4 Προσθέστε 100 μL Stop Solution

Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (≤ 0.150) από όλες τις άλλες τιμές. Οι τιμές σε Ο.Π. του ορού ελέγχου Cut-off, όταν αναλύεται εις τριπλούν, πρέπει να κυμαίνονται μέσα στο 25% της μέσης τιμής. Απορρίψτε την μη φυσιολογική τιμή και υπολογίστε και πάλι την μέση τιμή. Ο θετικός ορός πρέπει να έχει Ο.Π. ίση με 1,5 τουλάχιστον φορά την τιμή του Cut-off. Ο λόγος μεταξύ Αρνητικού ορού και Cut-off πρέπει να είναι ≤ 0.6 . Η Ο.Π. του cut-off πρέπει να είναι $\geq 0,2$ στα 450 nm και $\geq 0,16$ στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

1. Ποιοτικά αποτελέσματα

Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι ανώτερη από εκείνη του Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgG.

Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της τιμής της Ο.Π. του υπό εξέταση δείγματος και εκείνης του Cut-off (INDEX). Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2 .

Αμφίβολο: $= \pm 20\%$ του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8 .

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο επαναλάβετε την αμοληψία.

2. Ποσοτικά αποτελέσματα

Αυθαίρετες μονάδες (AU)

Τα θετικά αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε αυθαίρετες μονάδες με αυτή την απλή πράξη:

$$AU = \frac{\text{Ο.Π. δείγματος}}{\text{Ο.Π. Cut-Off}}$$

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Οροί που συλλέχθηκαν κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν είναι παρόντα μόνο τα αντισώματα IgM, μπορεί να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα με αυτή την τεχνική.

Η τιμή των IgM κατά της Ιλαράς πρέπει να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το kit Enzywell Measles IgM. Εναλλακτικά θα αναλυθεί ένα δεύτερο δείγμα που θα έχει συλλεχθεί 8-14 ημέρες μετά, για να εξακριβωθεί τυχόν αύξηση των IgG. Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα του τεστ θα πρέπει να συνεκτιμηθεί με άλλα δεδομένα προερχόμενα από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Η παρουσία αντισωμάτων IgG εναντίον ιών όπως ο Epstein Barr, ο Απλός Έρπης, ή η Παρωτίτιδα, δεν επηρεάζουν το τεστ.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν πειραματισμό, που έγινε σε ένα νοσοκομειακό εργαστήριο, αναλύθηκαν 85 δείγματα ορού, συγκριτικά με ένα άλλο ανοσοενζυμικό εμπορικό kit. Τα δείγματα στα οποία υπήρξε ασυμφωνία, αναλύθηκαν με τον ανοσοφθορισμό ως μέθοδο αναφοράς.

Τα αποτελέσματα μπορούν να συνοψιστούν έτσι όπως ακολουθεί:

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	-
DIESSE	+	56	0
	-	2	27

Η ευαισθησία της υπό εξέταση μεθόδου είναι 96,6%, ενώ η ειδικότητα είναι 100%.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια στο εσωτερικό της ανάλυσης που έγινε με 3 διαφορετικές παρτίδες

Cut-off n=12	Παρτίδα 027	Παρτίδα 028	Παρτίδα 029
Ο.Π.	0.38	0.57	0.47
CV%	3	6	3

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων και παρτίδων

Δείγμα	INDEX			Μέση Τιμή	CV%
	Παρτίδα 027	Παρτίδα 028	Παρτίδα 029		
1	0.4	0.5	0.7	0.5	28
2	1.4	1.2	1.5	1.4	13
3	3.6	2.8	4.2	3.5	20

16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ	ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε τον κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).

		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβετε το τεστ.
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφιση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφιση	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με πολύ αργό ρυθμό	Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια
	Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα	Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά την αναρρόφιση.
	Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής	Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε με ένα χαρτομάντιλο το πλακίδιο
Ανεπαρκής θερμοκρασία	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης
	Η ποσότητα του υποστρώματος που έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. D. Erdman et al. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
2. D. Erdman et al. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL MEASLES IgG

REF 91072 (48 tests)

REF 91080 (96 tests)

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ANTI SARAMPIÓN EN SUERO HUMANO COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL SARAMPIÓN.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La infección causada por el virus del sarampión fue vencida en los últimos años, debido a programas de vacunación de los niños. A pesar de esto, en casos en los cuales la vacunación no tuvo éxito y en los sujetos no vacunados, se notó una tendencia a la infección entre los adultos jóvenes. El sarampión, un paramixovirus, causa una infección respiratoria muy contagiosa que puede conducir a graves consecuencias, particularmente en los adultos. El screening de mujeres embarazadas, de adultos jóvenes y de otros grupos a riesgo, puede constituir un medio válido en la determinación del estado inmune.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). El antígeno del virus de sarampión purificado e inactivo, está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el sustrato para la peroxidasa. El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 48 determinaciones (REF 91072)
- Reactivos suficientes para 96 determinaciones (REF 91080)

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE

MICROPLACA 6x8 pocillos recubiertos de virus de Sarampión (REF 91072)

MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de virus de Sarampión (REF 91080)

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (MG seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido sin anticuerpos anti- Sarampión IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1 x 2 mL

Contenido: Suero humano diluido con anticuerpos anti- Sarampión IgG, en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional (Calibrador 0).

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x10 mL (REF 91072); 1 x 16 mL (REF 91080)

Contenido: anticuerpos monoclonales anti IgG humanos marcados con peroxidasa. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CONTROL IgG - IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Para la dilución de las muestras de suero.

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL Listo para su uso. **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 µL
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10.100.1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel adsorbente.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA	6 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CONTROL	6 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	6 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C,

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:

- a) El tampón de lavado contiene detergentes
- b) El conjugado contiene fenol
- c) El sustrato es ácido
- d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.

3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C..**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidrocilórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
 - instalación y requisitos específicos
 - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
 - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
 - mantenimiento y servicio técnico.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes.

Las muestras descongeladas se deben agitar con cuidado antes de la titulación. Evitar la inactivación de la muestra al calor. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.

El test no se puede aplicar el test a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.

- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H₂O). Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira.(100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.
- Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.
- Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.
- Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Poner 100 µL de la muestra diluida//controles en los pocillos. |
| | - |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (300 µL) |
| | - |
| STEP 2 | Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (300 µL) |
| | - |
| STEP 3 | Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 15 min. a T.A. |
| | - |
| STEP 4 | Añadir 100 µL de Solución Bloqueante |
| | - |
| | Leer la adsorbancia a 450 nm dentro de 30 min |

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 . La D.O. del cut-off debe ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

1. Resultados cualitativos

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgG específicas para el antígeno.

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off.

La muestra se considera:

Immune: si la concentración es > 1.2 .

No-immune: si la concentración es < 0.8 .

Dudoso: $\pm 20\%$ del cut-off.

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

2. Resultados cuantitativos

Unidades Arbitrarias (AU)

Los resultados positivos se pueden expresar en unidades arbitrarias con esta simple operación:

$$AU = \frac{\text{D.O. Muestra}}{\text{D.O. Cut-off}}$$

Generalmente esta relación se considera un valor “índice” de positividad.

12. LIMITACIONES

Las muestras recogidas durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativas con este procedimiento.

El nivel de las IgM anti- Sarampión tendría que ser determinado usando el kit Measles IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.

El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La presencia de anticuerpos IgG contra virus como Epstein Barr, Herpes Simplex, Parotiditis no afecta el resultado del test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 85 muestras de suero, en comparación con otro método inmunoenzimático comercial. Las muestras en desacuerdo, fueron analizadas con IFA como método de referencia. Los resultados pueden ser resumidos como sigue:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	56	0
	-	2	27

El kit Enzywell ofrece una sensibilidad del 96,6%, y especificidad del 100%.

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo ejecutada sobre 3 lotes distintos

Cut-off n=12	Lote 027	Lote 028	Lote 029
D.O.	0.38	0.57	0.47
CV%	3	6	3

Precisión en series y lotes

Muestra	INDEX			Media	CV%
	Lote 027	Lote 028	Lote 029		
1	0.4	0.5	0.7	0.5	28
2	1.4	1.2	1.5	1.4	13
3	3.6	2.8	4.2	3.5	20

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los	Asegurarse del buen funcionamiento del

	pocillos	lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. REFERENCES

5. D. Erdman et al. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
6. D. Erdman et al. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).



PRECAUTIONS D'UTILISATION

**ENZYWELL
MEASLES IgG**
REF 91072 (48 tests)**REF** 91080 (96 tests)

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IGG ANTI-ROUGEOLE DANS LE SERUM HUMAIN, EN TANT QU'AIDE AU DIAGNOSTIC D'UNE INFECTION DUE AU VIRUS DE LA ROUGEOLE.

2. INTERET CLINIQUE

Récemment, la rougeole a largement cessé d'être une maladie importante pour l'enfance grâce au programme d'immunisation. Toutefois, en cas d'échec de la vaccination ou chez des sujets non vaccinés, il y a eu une tendance à l'infection chez les jeunes adultes. La rougeole, un paramixovirus, provoque une infection très infectieuse de l'appareil respiratoire, avec des conséquences parfois très graves, en particulier chez les adultes. Le monitoring de l'état immunitaire des femmes enceintes, des jeunes adultes et d'autres sujets à risque est très important.

3. PRINCIPE

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigène, constitué du virus de la rubéole purifié et inactif, est lié à la phase solide (puits de la barrette 1x8). A travers l'incubation dans le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après des lavages permettant d'éliminer les protéines qui ne se sont pas liées, on effectue l'incubation avec le conjugué se constituant d'anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase.

Le conjugué qui ne s'est pas lié est éliminé et l'on ajoute le substrat. La couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum examiné.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 48 réactions (REF 91072).
- Le kit permet de réaliser 96 réactions (REF 91080).

Porter les réactifs à température ambiante avant de les utiliser.

MT PLATE MICROPLAQUE 6 x 8 puits sensibilisés avec le virus de la rougeole (REF 91072)

MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec le virus de la rougeole (REF 91080)

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (MG, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG anti-rougeole, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1 x 2 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG anti-rougeole, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 10 mL (REF 91072) ; 1 x 16 mL (REF 91080)

Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgG marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox..

Préparation : Prêt à l'emploi.

CONTROL IgG - CONTROLE NEGATIF IgG (PF93901) 1 x 1.6 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0,01 mol/l avec 1 % de BSA et 0,09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5 % de brij.

Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.

En présence de cristaux : chauffer la solution à **37 °C** pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 2 DILUANT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Pour diluer les échantillons de sérum.

Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09 % et de méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/ml) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l), pH = 3.8.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H₂SO₄ (à 0.3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)

FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à >= 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Compte-minutes
- Solution 5 % de sodium hypochlorite
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à 2-8 °C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette apposée sur la confection.

Les réactifs ont une stabilité limitée après l'aperture et/ou la préparation.

REACTIF	CONDITIONS
MICROPLAQUE	5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.
CONTROLES	5 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	5 semaines à 2/8 °C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8 °C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi pendant 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C.
SOLUTION D'ARRET	jusqu'à péremption à 2/8 °C.

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.

ATTENTION :

Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Bien que tous les produits d'origine humaine aient subi un contrôle de dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag HBs en utilisant des méthodes approuvées par la FDA, ils doivent cependant être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux.

Elimination des résidus: les échantillons de serum et les reactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS POUR LA SECURITE PERSONNELLE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des protections pour les yeux quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.

2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
 - a) Le tampon de lavage contient des détergents
 - bd) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol
 - c) Le substrat est acide.
 - d) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09 %). Les azides peuvent réagir avec les métaux des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.

En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Les instruments que ne sont pas à jeter doivent être stérilisés après l'emploi, de préférence en autoclave pendant 1 h à 121 °C. Les matériaux à jeter doivent être mis en autoclave ou incinérés.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les matériaux liquides à jeter, neutralisés avec une solution alcaline, doivent être désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 1 % au moins. Une exposition à l'hypochlorite de sodium 1 % pendant 30 minutes suffit pour garantir une désinfection efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1 %), avant de continuer le test. En présence d'un acide, on pourra utiliser l'hypochlorite de sodium seulement après avoir essuyé la zone. Tous les matériaux utilisés pour nettoyer un renversement accidentel doivent être éliminés comme étant potentiellement infectieux.

AVERTISSEMENTS ANALYTIQUES

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au-dessous de 35 °C ni au-dessus de 39 °C. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé 30 minutes à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter la contamination microbienne des réactifs parce que la validité peut se réduire et que les résultats peuvent être erronés.
3. Ne pas changer le procédé, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est interchangeable parmi différents lots. Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorite pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou au bain-marie. Autrement, il est possible de faire incuber les plaques dans une analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé, ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec les instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
 - à l'installation et aux avertissements spécifiques
 - aux principes opérationnels, aux instructions, précautions, risques
 - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
 - à la maintenance et à l'assistance technique.

7. ECHANTILLONS ET LEUR CONSERVATION

Les sérums frais ou décongelés peuvent être utilisés. Les échantillons peuvent être stockés à +2...+8 °C pendant 4 jours. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de trois décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés. Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

Préparation :

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :
Diluer la solution **de lavage concentrée** (par exemple : 100 ml + 900 ml d'eau distillée).

Exécution

Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10µl de sérum dans 1 mL de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Mettre dans une barrette les contrôles NON dilués (100 µl/puits). Le minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 seuil. Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µL), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter 100 µl du conjugué dans chaque puits.

Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt.

Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes.

9. SCHEMA D'ANALYSE

1e ETAPE Mettre 100 µl de sérum dilué/contrôles dans les puits de la barrette.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)

2e ETAPE Mettre 100 µl de conjugué dans les puits.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver pendant 30 secondes à 4 reprises (300 µL)

3e ETAPE Mettre 100 µl de substrat dans les puits.
Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.

4e ETAPE Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits.

Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (≤ 0.150).

Calculer les valeurs du contrôle seuil. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus de $\pm 25 \%$ de la valeur moyenne si l'analyse est faite en triple; sinon éliminer la valeur aberrante. Recalculer la moyenne.

Le contrôle positif doit avoir une D.O 1,5 fois supérieure à celle du sérum seuil.

Le rapport des D.O du contrôle négatif et du sérum seuil doit être $\leq 0,6$. La D.O. du contrôle seuil doit être ≥ 0.2 à 450 nm et ≥ 0.16 à 450/620 nm.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats qualitatifs

Si la valeur du D.O. du sérum est supérieure au sérum seuil, l'échantillon est positif en présence d'IgM spécifiques contre la rougeole.

Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Index).

L'échantillon est considéré comme étant :

Positif : si le rapport est > 1.2

Incertain: si le rapport est compris 0.8 et 1.2

Négatif : si le rapport est $> 0,8$

Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat est de nouveau incertain, réaliser de nouveaux prélèvements d'échantillons de sang.

Résultats quantitatifs

Unités arbitraires (UA)

Les résultats positifs peuvent être exprimés en unités arbitraires selon la formule suivante :

$$AU = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO contrôle seuil}}$$

12. LIMITES DE LA METHODE

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode. Le niveau des IgM anti-Rougeole doit être déterminé en utilisant le kit Enzywell Measles IgM. Autrement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard, devrait être contrôlé en parallèle pour déterminer un incrément des anticorps IgG. Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés avec d'autres observations.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

La présence d'anticorps IgG agissant contre des virus comme l'Epstein Barr, l'Herpes Simplex et la Parotidite ne fausse pas le résultat du test.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

85 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier. Les résultats ont été comparés avec ceux d'une autre méthode immunoenzymatique. Tous les échantillons discordants ont été analysés avec une méthode d'immunofluorescence utilisée en guise de référence. Les résultats sont reportés dans le tableau :

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	56	0
	-	2	27

Le kit Enzywell a une sensibilité de 96,6 % et une spécificité de 100 %.

15. PRECISION

Précision dans la série effectuée avec 3 lots différents

Cut off n=12	Lot 027	Lot 028	Lot 029
O.D.	0.38	0.57	0.47
CV %	3	6	3

Précision entre séries et entre lots

SOMMAIRE					
Echantillon	Lot 027	Lot 028	Lot 029	Moyenne	CV %
1	0.4	0.5	0.7	0.5	28
2	1.4	1.2	1.5	1.4	13
3	3.6	2.8	4.2	3.5	20

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler le processus. Contrôler s'il y a une solution inutilisée. Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire le mode d'emploi, paragraphe 4).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Session non valable (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle quantité de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que le laveur fonctionne correctement.
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement.
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur fonctionne

		correctement.
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement
	Ajout des réactifs trop long	Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Eviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec du papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Volume incorrect du substrat ajouté à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

7. D. Erdman et él. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
8. D. Erdman et él. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL MEASLES IgG

REF 91072 (48 tests)

REF 91080 (96 tests)

(PORTUGUÊS)

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O IgG Measles IgG é um método imuno-enzimático para a determinação qualitativa dos anticorpos de classe IgG do vírus do sarampo no soro humano, como uma ajuda no diagnóstico de Sarampo.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O sarampo, uma das principais doenças infantis, foi fortemente eliminado nos últimos anos graças às campanhas de imunização. Contudo, devido a uma falha na vacinação ou a existência de indivíduos que não foram vacinados, verifica-se uma tendência para jovens adultos ficarem infectados. O sarampo - um paramixovírus - causa uma infecção respiratória muito contagiosa que pode ter graves consequências, particularmente nos adultos. O exame de grávidas, jovens adultos e outros doentes de alto risco, relativamente aos anticorpos em circulação, é importante na determinação do estado de imunidade.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática).

O antígeno do vírus do sarampo purificado e inativado, liga-se à fase sólida (tiras de oito poços). As imunoglobulinas são ligadas ao antígeno por incubação com soro humano diluído.

Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto de anticorpos monoclonais IgG anti-humanos marcados com peroxidase (HRP).

O conjugado não ligado é eliminado e o substrato de peroxidase é adicionado.

A cor que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes na amostra de soro.

4. COMPONENTES DO KIT

Os reagentes são suficientes para 48 determinações (REF 91072)

Os reagentes são suficientes para 96 determinações (REF 91080)

Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA Tiras cobertas com antígenos do sarampo purificados e inativados 6x8 poços (REF 91072)

MICROPLACA Tiras cobertas com antígenos do sarampo purificados e inativados 12x8 poços (REF 91080)

Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (MG, seguido do número do lote), que é útil para fins de identificação, retire o suporte e as tiras da embalagem folheada para serem usadas e coloque as tiras não usadas no saco de polietileno com sílica gel, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONJ CONJUGADO 1x10 mL (REF 91072); 1 x 16 mL (REF 91080)

Conteúdo: anticorpos monoclonais IgG anti-humanos marcados com HRP, numa solução tampão fosfatada. Pronto a ser usado sem mais diluição.

Estabilidade: O produto fica estável até ao prazo de validade se armazenado a 2-8°C.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, contendo concentrações conhecidas de IgG anti-sarampo, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1 x 2 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, contendo concentrações conhecidas de IgG anti-sarampo, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L, com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogénio estabilizado num tampão de citrato, pH 3.8. Pronto a usar.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL. Para diluição de amostras de soro. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante .

WASH BUF 10X TAMPÃO DE LAVAGEM 10x (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0,5%.

Preparação: dilua o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ a 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas, comprimento de onda 450 ou 450/620 nm e 405 nm, com uma linearidade da DO até 2000 (no mínimo).
- Sistema de lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µL
- Água destilada ou desionizada.
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste etc.
- Micropipetas e pontas (10, 100, 1000 µL) com precisão de ± 2%
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente.

6. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo da embalagem

Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	6 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Soros de controlo	6 semanas a 2/8°C
Conjugado	6 semanas a 2/8°C
Substrato	até ao prazo de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
Diluyente de amostras	até ao prazo de validade a 2/8°C
Tampão de lavagem	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.
Solução de paragem	até ao prazo de validade a 2/8°C.

6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES**PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA**

Para uso diagnóstico in vitro.

Este kit contém materiais de origem humana que foram testados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá oferecer uma garantia completa no que respeita a ausência de agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.

- Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave bem as mãos quando tiver terminado.
- Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
 - i) O tampão de lavagem contém detergentes

- j) O conjugado e os controlos contêm fenol
- k) O substrato é ácido
- l) Os controlos contêm azida de sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele e ou os olhos, lave a área com água abundante.

- O equipamento não descartável deve ser esterilizado após a sua utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
- O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e o ácido hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
- Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1.0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
- Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com um lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1.0%, por exemplo, antes do trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- **Conserve a 2-8°C**
- Aguarde que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35°C nem sobe acima de 39°C.**
- Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
- Não utilize reagentes além do prazo de validade indicado. Deve evitar-se a contaminação microbiológica de reagentes, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
- Não modifique o procedimento de teste nem substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a menos que estejam indicados como intercambiáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
- Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
- Evite a utilização de congeladores auto-descongeláveis para armazenamento de amostras.
- Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
- Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
- Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
- Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “sopre” as microplacas.
- Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num incubador. Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.
- Certifique-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa.
- A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
- O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
- Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o manual de instruções do fabricante para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
 - instalação e requisitos particulares
 - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e reparação.

7. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta por soro recolhido de forma normal numa veia e manuseado com todas as precauções ditadas pelas boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a

-20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente misturadas antes de efectuar o teste. Evite a inactivação por calor da amostra. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que conduza a resultados erróneos.

Devem evitar-se amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas.

O teste não é aplicável ao plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Prepare a quantidade necessária de tiras.
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 ml + 900 mL H₂O).

PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

Dilua as amostras na proporção de 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço (A1) para o branco, que será realizado distribuindo 100 µL de substrato e apenas 100 µL de solução de paragem. Coloque 100µ de controlo Positivo, Negativo e Directo NÃO DILUÍDOS nos poços designados. O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo. Nos poços a seguir, coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados).

Cubra os poços com película protectora e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (em 300 µl, com 30 segundos de tempo de enxaguamento para cada ciclo), adicione 100 µL de conjugado em cada poço (excepto no poço A1) e volte a incubar durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com película protectora. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Por fim, distribua 100 µl do substrato em todos os poços (incluindo o primeiro para o branco).

Interrompa a reacção enzimática após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente com 100 µL de solução de paragem.

Leia a D.O. a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

Deixe o primeiro poço (A1) vazio para o branco

- L. Pipete 100 µL de controlo Positivo, Directo e Negativo não diluído nos poços designados.
- M. Nos poços subsequentes, pipete 100 µL de amostras diluídas
- N. Incube durante 45 minutos a 37°C
- O. Lave quatro vezes. (30'' de tempo de enxaguamento; 300 µL)
- P. Adicione 100 µL de conjugado em cada poço (à excepção do poço A1)
- Q. Incube durante 45 minutos a 37°C
- R. Lave quatro vezes. (30'' de tempo de enxaguamento; 300 µL)
- S. Adicione 100 µL de substrato a cada poço (incluindo o poço A1)
- T. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente
- U. Adicione 100 µl de solução de paragem (incluindo o poço A1)
- V. Leia a absorvência a 450/620/450 nm dentro de 30 min.

10. VALIDADE DO ENSAIO

A D.O. do branco deve ser de ≤ 0.150 . Subtraia o valor da densidade óptica (D.O.) do branco de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo directo (quando testados em triplicado) devem estar dentro de 25% do valor médio. Ignore qualquer valor anormal e volte a calcular a média. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vezes a do soro directo. A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser ≤ 0.6 . O valor de D.O. do directo deve ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. CÁLCULO QUALITATIVO

Subtraia a D.O. do branco de todas as leituras para obter DOS líquidas. Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor directo. Esta relação é o Índice Directo (COI).

COI= DO da Amostra/DO Directa

A amostra é considerada:

Positiva: se o COI for > 1.2 .

Duvidosa: Se o COI estiver entre 0.8-1.2 (Directo $\pm 20\%$)

Negativa: se o COI for < 0.8 .

Se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda de infecção, quando apenas estão presentes anticorpos IgM, pode revelar-se negativa por este procedimento.

O nível de IgM do sarampo deve ser determinado usando o kit Measles IgM. Em alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias mais tarde deve ser tratada em paralelo para determinar um aumento de nível de anticorpos IgG. O resultado de teste deve ser usado juntamente com as informações disponíveis da avaliação de outros procedimentos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

A presença de anticorpos IgG para vírus como o Epstein Barr, Herpes Simplex e Papeira, não tem influência no resultado do teste.

14. ESPECIFICIDADE CLÍNICA E SENSIBILIDADE RELATIVA

Num ensaio clínico executado num laboratório de hospital, 85 amostras foram analisadas em paralelo com outro método imuno-enzimático disponível no mercado. As amostras cujos resultados apresentavam discordâncias entre os dois métodos, foram testadas pelo IFA, na qualidade de método de referência.

Os resultados podem ser resumidos do seguinte modo:

		Método de referência	
		Positivo	Negativo
Diesse	Positivo	56	0
	Negativo	2	27

A sensibilidade relativa do método foi de 96,6%, enquanto que a especificidade relativa foi de 100%.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaios efectuada em três lotes diferentes

Valor directo <i>n</i> =12	Lote 027	Lote 028	Lote 029
<i>D.O.</i>	0.38	0.57	0.47
<i>CV%</i>	3	6	3

Precisão entre testes e entre lotes

	ÍNDICE DIRECTO				
Amostra	Lote 027	Lote 028	Lote 029	Média	CV%
1	0.4	0.5	0.7	0.5	28
2	1.4	1.2	1.5	1.4	13
3	3.6	2.8	4.2	3.5	20

16. SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no folheto da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dessecante de sílica gel deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substrato.
	Lavagem inadequada	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem

	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções de utilização recomendadas.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. D. Erdman et al. Evaluation of monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for detection of specific antibodies to measles virus. J. Clin. Microbiology 29, 1466 (1991).
2. D. Erdman et al. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. J. Med. Virol. 41, 44 (1993).

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbrikante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para “n” ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote



Diesse Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni, Italy
Tel. 0577-587111