



ENZYWELL

VARICELLA IgM

REF 91079 (48 tests)

REF 91089 (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 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / 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 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ 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 / ΕΓΚΥΠΟΤΗΤΑ ΤΟΥ TEST 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 VARICELLA ZOSTER IgM

REF 91079 (48 tests) **REF** 91089 (96 tests)

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

METODO IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI VARICELLA ZOSTER NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELLA VARICELLA.

2. INTRODUZIONE

La Varicella e l'Herpes Zoster costituiscono due manifestazioni cliniche prodotte dall'infezione da parte del Virus della Varicella Zoster (VZV).

La Varicella è una malattia fortemente contagiosa che risulta generalmente dall'infezione primaria con il VZV e colpisce comunemente i bambini. L'infezione da VZV durante la gravidanza può causare malattie o malformazioni del feto, mentre a termine della gravidanza l'infezione può portare anche alla morte del neonato.

L'Herpes Zoster è una malattia soprattutto degli adulti che sembra essere causata da una riattivazione del virus, che può rimanere latente per lunghi periodi nei gangli sensoriali spinali in seguito all'infezione primaria. L'infezione causa delle eruzioni cutanee dolorose lungo la distribuzione dei nervi coinvolti.

I metodi sierologici sono quelli generalmente adoperati per la determinazione dello stato immunitario in soggetti a rischio (soprattutto gli immunodepressi) e la diagnosi (sia pre- che post-natale) di soggetti infetti da VZV.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle IgM anti varicella si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline da parte di anticorpi monoclonali anti IgM umane presenti sulla fase solida. Una successiva incubazione con l'antigene della varicella complessato con monoclonale coniugato a perossidasi di rafano selezionerà gli anticorpi IgM specifici per l'antigene e rivelabili per aggiunta del substrato per la perossidasi.

Quando la reazione enzimatica è interrotta dall'aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione diventa gialla. Il colore, proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero, può essere letto in un lettore per micropiastre ELISA.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 48 determinazioni (REF 91079)
- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni (REF 91089)
- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 3 x 2 strips (REF 91079), 6 x 2 strips (REF 91089) sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (M, seguita 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 in tampone fosfato 0.01 mol/L con 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 2.5 mL

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

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONJUGATE 1 x 10 mL (REF 91079); 1 x 18 mL (REF 91089)

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali marcati con perossidasi in soluzione di tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02% e liquido ascitico di topo.

Preparazione: Pronto all'uso.

L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti circa prima dell'uso.

Ag ANTIGENE Liofilo x 3 fiale (REF 91079), x 6 fiale (REF 91089)

Contenuto: Varicella Zoster Virus parzialmente purificato e reso non infettivo tramite trattamento con beta-propiolattone, in tampone fosfato 0,04 mol/L, pH 7,2 e lattosio.

Preparazione: Ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta, agitando per inversione.

CONTROL IgM - IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano 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 **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Pronto all'uso.

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°
- 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 da 225-375 µL
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette e puntali capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
ANTIGENE RICOSTITUITO	5 gg 2/8°C se ricostituito con coniugato; (-20°C se ricostituito con Wash Buffer. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti; vedi avvertenza analitica n. 1).
CONIUGATO	5 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 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

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

Attenzione:

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

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 controlli 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 disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. **L'antigene ricostituito con il coniugato non è stabile dopo congelamento. Nel caso fosse previsto un consumo ridotto di antigene si può procedere come segue: Ricostituire l'antigene in 1/10 del volume riportato in etichetta con Wash Buffer pronto uso (es. volume in etichetta 3 ml: ricostituire con 0,3 ml di Wash Buffer). Prelevare il quantitativo di antigene necessario all'esecuzione del test e miscelare con 10 parti di coniugato. Aliquotare e congelare il restante antigene. Al momento dell'uso, scongelare e miscelare con 10 parti di coniugato.**
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
6. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
7. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
8. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
9. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
10. 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.

11. 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.
12. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
13. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
14. 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 e 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. L'inattivazione al calore non fornisce risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta) oppure, in caso di minore consumo, con Wash Buffer pronto uso (1 decimo del volume in etichetta) e poi 1/11 nel coniugato.

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 di immunocomplesso (antigene/anticorpi monoclonali marcati con POD) 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 di siero diluito e 100 µL dei controlli nei pozzetti dello strip. |
| | — |
| | incubare 45 min. a 37°C |
| | — |
| | lavare 4 volte (300 µl) |
| STEP 2 | Mettere 100 µL di immunocomplesso 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

Risultati qualitativi

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

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (INDEX).

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.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri dati provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 63 sieri contenenti potenziali interferenti quali:

- Sieri provenienti da donne in gravidanza (n=12)
- Parvovirus IgM (n=3)
- CMV IgM (n=12)
- HSV IgM (n=5)
- VCA IgM (eterofili) (n=5)
- Rubella IgM (n=5)
- Morbillo IgM (n=5)
- Mumps IgM (n=5)
- Fattore Reumatoide (fino a 1080 UI/dl) (n=5)
- Bilirubina (fino a 11 mg/dl)(n=5)
- Trigliceridi (fino a 1281 mg/dl) (n=5)
- Altamente emolizzati (n=3).

In nessun caso si sono osservate interferenze.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica esterna, 154 campioni erano analizzati con il nostro kit in parallelo al metodo di routine.

I sieri erano divisi in 5 pannelli diversi:

- Pannello 1: 56 campioni provenienti da pazienti con infezione recente da varicella
- Pannello 2: 10 campioni provenienti da pazienti con reinfezione come dimostrato dalla sierconversione o da un aumento del titolo anticorpale in CFT
- Pannello 3: 15 campioni da pazienti con infezione recente da Citomegalovirus, contenenti IgM anti-CMV.
- Pannello 4: 8 campioni positivi per la mononucleosi infettiva caratterizzati dalla presenza di IgG ed IgM anti-VCA e per l'assenza di anticorpi anti-EBNA.
- Pannello 5: 65 campioni provenienti dalla popolazione generale, 61 dei quali contenevano anticorpi IgG anti-Varicella.

Il confronto delle performances dei due tests mostra un accordo del 99,4% fra i due (153/154), con una sensibilità del 100% (63/63) ed una specificità del 98,8% (90/91).

15. PRECISIONE**Precisione nella prova**

Campione	VZC 1 (Negativo< CutOff)	VZC 2 (Positivo>Cut Off)	VZC 3 (Positivo)	Cut Off	Controllo Positivo
n (repliche)	24	24	24	12	12
D.O.	0.115	0.511	1.769	0.292	1.755
CV%	10	5	5	9	6

Precisione tra prove

Campione	Index D.O. Campione/D.O. Cut-off	
	Media	CV%
Controllo Pos.	6.1	2
VZC1	0.4	6
VZC2	1.8	16
VZC3	6.9	4

Precisione fra lotti

Campione	Index			Media	CV%
	Lot n. 034	Lot n. 035	Lot n. 036		
Controllo Positivo	5.7	5.8	6.1	5.9	4
VZC1	0.3	0.4	0.4	0.4	16
VZC2	1.3	2.0	2.0	1.8	23
VZC3	4.9	6.2	6.5	5.9	15

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi IFU punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	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. BIBLIOGRAFIA

1. E.H. Wasmuth and W.J. Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
2. M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
3. P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology 25: 2059 (1987).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL VARICELLA ZOSTER IgM

REF 91079**(48 tests)****REF 91089****(96 tests)****(English)**

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO VARICELLA ZOSTER IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF VARICELLA VIRUS INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Varicella and Herpes Zoster are two clinical manifestations resulting from infection by Varicella Zoster Virus (VZV).

Varicella, or chicken pox, is a highly contagious disease which is generally a consequence of primary infection by VZV and normally affects children. Infection caused by VZV during pregnancy can cause disease or malformation of the fetus; if it occurs at the end of pregnancy it may lead to the death of the neonate.

Herpes Zoster is a disease which chiefly affects adults and appears to be caused by a reactivation of the virus, which can remain latent for long periods in the spinal sensorial ganglia following primary infection. The infection causes painful cutaneous eruptions along the path of the nerves affected.

Serological methods are usually adopted to determine the immune state of subjects at risk (chiefly immunodepressed patients) and in pre- and post-natal diagnosis of infected subjects.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test for the assay of anti-Varicella Zoster IgM is based on the principle of the capture of these immunoglobulins by anti-human IgM monoclonal antibodies found on the solid phase. A subsequent incubation with varicella antigen in a complex with monoclonal antibodies conjugated to horse radish peroxidase selects the IgM antibodies specific for the antigen and is revealed by the addition of the peroxidase substrate. When the enzymatic reaction is stopped by the addition of a sulphuric acid solution, a yellow colouring forms. The colour, which is proportional to the amount of specific antibodies present in the sample, can be read in an ELISA microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 48 determinations (REF 91079)
- Reagents are sufficient for 96 determinations (REF 91089)
- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 3 x 2 strips (REF 91079); 6 x 2 strips (REF 91089) coated with anti-human IgM monoclonal antibodies.

Use: open the package at the opposite end from the code (M followed by 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 in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL 1 x 2.5 mL

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

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

CONJ CONJUGATE 1 x 10 mL (REF 91079); 1 x 18 mL (REF 91089)

Contents: monoclonal antibodies labelled with peroxidase, in phosphate buffer with mouse ascitic fluid, phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Preparation: Ready for use without further dilution. The immunocomplex must be prepared 45 minutes before use.

Ag ANTIGEN Freeze-dried x 3 vials (REF 91079), x 6 vials (REF 91089)

Contents: Partially purified Varicella Zoster virus inactivated by treatment with Beta-propiolactone, in phosphate buffer 0.04 mol/L and lactose, pH 7.2.

Preparation: reconstitute with the conjugate volume shown on the label, mixing by inversion.

CONTROL IgM - IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Diluted 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 (PF93619) 1 x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 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 nm 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	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control sera	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Reconstituted antigen	5 days at 2/8°C if reconstituted with conjugate; (-20°C if reconstituted with Wash Buffer. Avoid repeated freezing/thawing. See “Analytical Precautions” no. 1).
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	ready for use 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.

Caution:

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 0.9% 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. **The antigen reconstituted with conjugate is not stable after freezing. In the case of a limited consumption of antigen, proceed as follows: Reconstitute the antigen in 1/10 of the volume reported on the label with Wash Buffer ready for use (eg. volume reported on the label 3 ml: reconstitute with 0.3 ml of Wash Buffer). Take the amount of antigen necessary for immediate use and mix with 10 parts of conjugate. Aliquot and freeze the remaining antigen. At the time of use, thaw and mix with 10 parts of conjugate.**
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
7. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
8. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
9. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
10. 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.
11. 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.
12. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
13. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
14. 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 shaken before performing the test. Heat inactivation does not lead to erroneous results. 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 cannot be performed on human plasma.

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Prepare the antigen by reconstituting the freeze-dried product directly with the conjugate (volume shown on label). In the case of reduced consumption of the Ag, reconstitute with Wash Buffer ready for use (1/10 of the volume shown on the label) and then 1/11 in the conjugate.

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 1 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 immunocomplex (antigen/labelled monoclonal antibodies) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Manual Technique

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 immunocomplex 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. VALIDATION OF THE TEST

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. Cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm, and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

If the OD of the sample is higher than the Cut-off the sample is positive for the presence of specific IgM.

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.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The results must always be interpreted together with other clinical and diagnostic data.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

63 serum samples containing potentially interfering substances were tested:

- Serum from pregnant women (n=12)
- Parvovirus IgM (n=3)
- CMV IgM (n=12)
- HSV IgM (n=5)
- VCA IgM (heterophyl Ab) (n=5)
- Rubella IgM (n=5)
- Measles IgM (n=5)
- Mumps IgM (n=5)
- Rheumatoid Factor (up to 1080 UI/dl) (n=5)
- Bilirubin (up to 11 mg/dl)(n=5)
- Triglycerides (up to 1281 mg/dl) (n=5)
- Strongly hemolyzed samples (n=3).

No interference was observed in any case.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In an external experimentation, 154 samples were tested with the present kit in parallel with the routine method in use in the laboratory.

The samples were divided into 5 different panels:

- Panel 1: 56 samples from patients with a recent varicella infection
- Panel 2: 10 samples with reinfection as demonstrated by serum-conversion or by an increase in the antibody titer in CFT
- Panel 3: 15 samples from patients with a recent infection caused by Cytomegalovirus, containing IgM anti-CMV.
- Panel 4: 8 samples which were positive for infectious mononucleosis, characterized by the presence of IgG and IgM anti-VCA and by the absence of anti-EBNA antibodies.
- Panel 5: 65 samples from the general population, 61 of which contained anti-Varicella IgG.

A comparison of the performance of the two kits shows 99.4% agreement between the two (153/154), with a sensitivity of 100% (63/63) and a specificity of 98.8% (90/91).

15. PRECISION

Precision “in run”

Sample	VZC 1 (Negative< Cut Off)	VZC 2 (Positive>Cut Off)	VZC 3 (Positive)	Cut Off	Positive Control
n (replicates)	24	24	24	12	12
O.D.	0.115	0.511	1.769	0.292	1.755
CV%	10	5	5	9	6

Precision “between runs”

Sample	Index	
	Average	CV%
Positive Control	6.1	2
VZC1	0.4	6
VZC2	1.8	16
VZC3	6.9	4

Precision between batches

Sample	Index			Average	CV%
	Lot n. 034	Lot n. 035	Lot n. 036		
Positive Control	5.7	5.8	6.1	5.9	4
VZC1	0.3	0.4	0.4	0.4	16
VZC2	1.3	2.0	2.0	1.8	23
VZC3	4.9	6.2	6.5	5.9	15

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

- 1.E.H. Wasmuth and W.J. Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
- 2.M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
- 3.P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology 25: 2059 (1987).



GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZYWELL VARICELLA IgM

REF 91079 (48 Bestimmungen) **REF 91089 (96 Bestimmungen)**

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

Varicella IgM ist eine immunoenzymatische „Capture“-Methode zur qualitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Varicella-Zoster-Virus in humanem Serum.

2. PHYSIOLOGIE

Varicella und Herpes zoster sind zwei klinische Manifestationen einer Infektion mit dem Varicella-Zoster-Virus (VZV). Varizellen (Windpocken) sind eine sehr ansteckende Krankheit, die in der Regel eine Folge der VZV-Primärinfektion ist und vorwiegend bei Kindern auftritt. Eine Infektion mit VZV während der Schwangerschaft kann eine Erkrankung oder Missbildung des Fötus verursachen; am Ende der Schwangerschaft kann eine Infektion zum Tod des Neugeborenen führen. Herpes zoster ist eine Krankheit, die hauptsächlich bei Erwachsenen auftritt und durch eine Reaktivierung des Virus verursacht zu sein scheint, das nach einer Primärinfektion über lange Zeit latent in den sensorischen Spinalganglien verbleibt. Die Infektion verursacht schmerzhaften Hautausschlag entlang der betroffenen Nervenbahnen. Serologische Methoden werden gewöhnlich zur Bestimmung des Immunstatus von Risikopatienten (vorwiegend immunsupprimierte Patienten) und bei der prä- und postnatalen Diagnostik infizierter Patienten eingesetzt.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der „Capture-Methode“ mit Hilfe von monoklonalen Anti-human-IgM-Antikörpern, die an die Festphase gebunden sind. In der darauf folgenden Inkubation mit Varicella-Antigen in einem Komplex mit monoklonalen Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gebunden sind, werden die antigenspezifischen IgM-Antikörper erfasst und durch die Zugabe von Peroxidase-Substrat angezeigt. Wenn die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäurelösung gestoppt wird, entsteht eine gelbe Farbe. Die Farbe, die proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern in der Probe ist, kann mit einem ELISA-Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

4. INHALT DES KITS

- Die Reagenzien sind ausreichend für 48 Bestimmungen (REF 91079)
- Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen (REF 91089)
- **Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.**

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 6x8 Streifen (REF 91079), 12x8 Streifen (REF 91089), beschichtet mit monoklonalen Anti-human-IgM-Antikörpern.

Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (M 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 91079), 1 x 18 mL (REF 91089)

Inhalt: Monoklonale Antikörper, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, in Phosphatpuffer mit 0,05 % Phenol und 0,02% Bronidox.

Rekonstitution: Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung. Der Immunkomplex muss 45 Minuten vor Gebrauch hergestellt werden.

Ag ANTIGEN Lyophilisiert; 3 Fläschchen (REF 91079), 6 Fläschchen (REF 91089)

Inhalt: Teilweise gereinigtes Varicella-Zoster-Virus, inaktiviert durch Behandlung mit beta-Propiolacton, in 0,04 mol/l Phosphatpuffer und Laktose, pH 7,2.

Rekonstitution: Mit Konjugat rekonstituieren. Das Rekonstitutionsvolumen ist auf den Fläschchenetiketten angegeben.

CONTROL + POSITIVKONTROLLSERUM 1 x 1.6 mL

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

Farbe: Die Farbe des Kontrollserums ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF KONTROLLSERUM 1 x 2.5 mL

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

Farbe: Die Farbe des Kontrollserums ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL IgM NEGATIVKONTROLLE (PF93900) 1 x 1.6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Verdünntes 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 Gebrauchsfertig **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: 0,26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0,01 % Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0,05 mol/l Zitratpuffer (pH 3,8).

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.

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	5 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel
KONTROLLSERUM	5 Wochen bei 2-8 °C
KONJUGAT	5 Wochen bei 2-8 °C
IMMUNKOMPLEX	5 Tage bei 2-8 °C bei Rekonstitution mit Konjugat (-20 °C bei Rekonstitution mit Waschpuffer. Wiederholtes Einfrieren / Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Siehe „Technische Vorsichtsmaßnahmen“, Nr. 1.)
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	gebrauchsfertig 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

- Das mit dem Konjugat rekonstituierte Antigen ist nicht stabil, nachdem es eingefroren wurde. Gehen Sie bei einem begrenzten Antigenverbrauch wie folgt vor: Rekonstituieren Sie das Antigen mit gebrauchsfertigem Waschpuffer (in 1/10 des auf dem Etikett angegebenen Volumens; Beispiel: Bei einem auf dem Etikett angegebenen Volumen von 3 ml mit 0,3 ml Waschpuffer rekonstituieren). Nehmen Sie die für den sofortigen Gebrauch benötigte Menge Antigen und mischen Sie sie mit 10 Teilen Konjugat. Das restliche Antigen aliquotieren und einfrieren. Zum Gebrauch auftauen und mit 10 Teilen Konjugat mischen.
- 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. Eine Hitzeinaktivierung führt nicht zu falschen Ergebnissen. 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 Humanplasmaproben 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).
- Bereiten Sie den Immunkomplex vor, indem Sie das lyophilisierte Antigen mit Konjugat rekonstituieren. Das erforderliche Konjugatvolumen ist auf dem Antigen-Fläschchenetikett angegeben. Bei reduziertem Verbrauch des Ag mit gebrauchsfertigem Waschpuffer (1/10 des auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumens) und dann 1/11 Konjugat rekonstituieren.

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 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 Immunkomplex (Antigen, monoklonale Antikörper, 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 (A1) für den Substratleerwert frei lassen.

- 100 µl unverdünnte Kontrolle in die entsprechenden Wells pipettieren.
- 100 µl verdünnte Probe in die entsprechenden Wells pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl, mit 30 Sekunden Einwirkzeit).
- Zu allen Wells außer Well A1 100 µl Immunkomplex 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.

10. VALIDITÄT DES TESTS

Die OD des Substratleerwerts muss $\leq 0,150$ sein. Subtrahieren Sie diesen Wert von allen Extinktionen. Die Extinktion der Einzelwerte der Cut-Off-Kontrolle muss bei einer Dreifachbestimmung innerhalb von 25 % des Extinktionsmittelwertes liegen. Abweichende Werte verwerfen und den Mittelwert neu berechnen. Die Extinktion der Positivkontrolle muss

mindestens das 1,5fache der Extinktion des Cut-Off-Werts 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 die Ratio $> 1,2$ ist,

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

negativ: wenn die Ratio $< 0,8$ ist.

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

Die Ergebnisse sollten immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

63 Serumproben, die potentiell interferierende Substanzen enthielten, wurden gemessen:

- Serum von schwangeren Frauen (n=12)
- Parvovirus-IgM (n=3)
- CMV-IgM (n=12)
- HSV-IgM (n=5)
- VCA-IgM (heterophile Antikörper) (n=5)
- Rubella-IgM (n=5)
- Masern-IgM (n=5)
- Mumps-IgM (n=5)
- Rheumafaktor (bis zu 1080 IU/dl) (n = 5)
- Bilirubin (bis zu 11 mg/dl) (n=5)
- Triglyceride (bis zu 1.281 mg/dl) (n=5)
- Stark hämolysierte Proben (n=3)

In keinem Fall wurde dieser Test durch das Vorhandensein dieser Antikörper beeinflusst.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Extern wurden 154 Proben mit diesem Kit und parallel mit der im Labor verwendeten Referenzmethode getestet.

Die Proben wurden in 5 Testansätze unterteilt:

- Testansatz 1: 56 Proben von Patienten mit einer kürzlich aufgetretenen Varicella-Infektion
- Testansatz 2: 10 Proben mit Reinfektion, nachgewiesen durch Serokonversion oder durch eine Erhöhung des Antikörpertiters mittels KBR
- Testansatz 3: 15 Proben von Patienten mit einer durch Cytomegalovirus verursachten kürzlich aufgetretenen Infektion, mit Anti-CMV-IgM-Antikörpern
- Testansatz 4: 8 Proben, die positiv waren für Mononukleose und durch das Vorliegen von Anti-VCA-IgG- und IgM-Antikörpern sowie das Fehlen von Anti-EBNA-Antikörpern gekennzeichnet waren
- Testansatz 5: 65 Proben aus der allgemeinen Bevölkerung, davon 61 mit Anti-Varicella-IgG-Antikörpern

Ein Vergleich der Testcharakteristika zeigte 99,4 % Übereinstimmung zwischen den beiden Kits (153/154). Die relative Sensitivität des Kits betrug 100 % (163/163), die relative Spezifität 98,8 % (90/91).

15. PRÄZISION

Präzision in der Serie

Probe	VZC 1 (Negativ < Cut-Off)	VZC 2 (Positiv > Cut-Off)	VZC 3 (Positiv)	Cut Off	Positivkontrolle
n	24	24	24	12	12
O.D.	0,115	0,511	1,769	0,292	1,755
CV%	10	5	5	9	6

Interassay-Präzision

Probe	Index	
	Mittelwert	CV%
Positivkontrolle	6,1	2
VZC1	0,4	6
VZC2	1,8	16
VZC3	6,9	4

Lot-zu-Lot-Präzision

Probe	Cut-Off-Index			Mittelwert	CV%
	Lotnr. 034	Lotnr. 035	Lotnr. 036		
Positiv-kontrolle	5,7	5,8	6,1	5,9	4
VZC1	0,3	0,4	0,4	0,4	16
VZC2	1,3	2,0	2,0	1,8	23
VZC3	4,9	6,2	6,5	5,9	15

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

- E.H. Wasmuth and W.J. Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
- M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
- P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology 25: 2059 (1987).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL IgM ANEMOΒΛΟΓΙΑΣ

REF 91079(48 tests)

REF 91089(96 tests)

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgM ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΑΝΕΜΟΒΛΟΓΙΑΣ/ΕΡΠΗΤΑ ΖΩΣΤΗΡΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

2. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η Ανεμοβλογιά και ο Έρπητας Ζωστήρας αποτελούν δύο κλινικές εκδηλώσεις που προέρχονται από λοίμωξη από τον ιό του Έρπητα Ζωστήρα (VZV).

Η Ανεμοβλογιά είναι μία οξεία μεταδοτική νόσος που προκαλείται σε γενικές γραμμές από την πρωτογενή λοίμωξη από τον VZV και προσβάλλει συνήθως τα μικρά παιδιά. Η προσβολή από λοίμωξη με VZV, κατά την εγκυμοσύνη, μπορεί να προκαλέσει παθολογικές επιπτώσεις ή ατελή διάπλαση στο έμβρυο, ενώ εάν η λοίμωξη λάβει χώρα κατά το τέλος της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει ακόμη και τον θάνατο του νεογνού.

Ο Έρπητας Ζωστήρας είναι μία νόσος που προσβάλλει κυρίως τους ενήλικες και φαίνεται ότι προκαλείται από μία επανενεργοποίηση του ιού, που μπορεί να μείνει σε λανθάνουσα κατάσταση για μεγάλη χρονική περίοδο στα νωτιαία αισθητικά γάγγλια μετά από την πρωτογενή λοίμωξη. Η λοίμωξη προκαλεί επώδυνες φλύκταινες στο δέρμα, κατά μήκος των εμπλεγμένων νεύρων.

Οι ορολογικές μέθοδοι είναι εκείνες που χρησιμοποιούνται κατά κανόνα, για τον προσδιορισμό της ανοσολογικής κατάστασης των ατόμων που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου (ιδιαίτερα οι ασθενείς με ανοσοκαταστολή), καθώς και στην διάγνωση (προ- και μετα-γεννητική) στα άτομα που πάσχουν από VZV.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ προσδιορισμού των IgM κατά του ιού ανεμοβλογιάς/έρπητα ζωστήρα βασίζεται στην αρχή της σύλληψης και της συλλογής αυτών των ανοσοσφαιρινών από τα αντι-ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα IgM που είναι παρόντα στη στερεά φάση. Στη συνέχεια, μία επώαση με το αντιγόνο του έρπητα ζωστήρα συνδεδεμένο με μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση ραφανίδων, θα επιλέξει τα ειδικά αντισώματα IgM για το αντιγόνο, που ανιχνεύονται με την προσθήκη του υποστρώματος υπεροξειδάσης.

Όταν η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος θεικού οξέος, ο χρωματισμός γίνεται κίτρινος. Το χρώμα, ανάλογο της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον ορό, μπορεί να διαβαστεί σε έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων ELISA.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 48 τεστ (REF 91079)
- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ (REF 91089)
- **Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 3 x 2 κυψελίδες (REF 91079), 6 x 2 κυψελίδες (REF 91089) ευαισθητοποιημένες με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgM.

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (Μ ακολουθούμενο 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, 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 2.5 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός, 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 91079); 1 x 18 mL (REF 91089)

Περιεχόμενο: διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων σεσημασμένα με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%.

Προετοιμασία: έτοιμο για χρήση.

Το ανοσοσύμπλοκο πρέπει να έχει προετοιμαστεί 45 λεπτά πριν από τη χρήση.

Ag ANTIGONO Κρυο-αφυδατωμένο x 3 αμπούλες (REF 91079), x 6 αμπούλες (REF 91089)

Περιεχόμενο: Ιός Ανεμοβλογιάς/Ερπητα Ζωστήρα, μερικώς κεκαθαρμένος και που έχει καταστεί μη μολυσματικός μετά από επεξεργασία με β-προπιολακτόνη (Beta-propiolactone), σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,04 mol/L, pH 7,2 που περιέχει γαλακτόζη.

Προετοιμασία: Κάνετε την ανασύσταση προσθέτοντας τον όγκο του συζυγούς που αναγράφεται στην ετικέτα και στη συνέχεια ανακατέψτε το αναποδογυρίζοντάς το.

CONTROL IgM - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

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

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ 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 αραίωση.

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

Χρησιμοποιείται για την αραίωση 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 **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Έτοιμο για χρήση.

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 STOP SOLUTION (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

5 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο

ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟ

5 ημέρες σε 2/8°C αν έχει ανασυσταθεί με το συζυγές. (-20°C αν έχει ανασυσταθεί με το Wash Buffer. Αποφεύγετε επανειλημμένες καταψύξεις και αποψύξεις (βλ. αναλυτικές οδηγίες αρ. 1).

ΣΥΖΥΓΕΣ

5 εβδομάδες 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

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ 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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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

1. 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.
2. 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.
3. Μην αλλάζετε 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.
4. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
5. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
6. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.

7. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
8. Μην ακουμπάτε το χεῖλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
9. 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.
10. 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.
11. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
12. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
13. 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

Τεχνική manual

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες.
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H₂O)
- Ετοιμάστε το αντιγόνο μέσω της ανασύστασης του κρυο-αφυδατωμένου προϊόντος με το συζυγές (ο όγκος που είναι απαραίτητος υποδεικνύεται στην ετικέτα) ή, σε περίπτωση χαμηλότερης κατανάλωσης, με το Wash Buffer έτοιμο για χρήση (1 δέκατο του αναγραφόμενου στην ετικέτα, όγκου) και μετά 1/11 στο συζυγές.

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 µL ορού σε 1 mL διαλύτη και ρίξτε 100 µL κάθε αραιωμένου δείγματος ανά κυψελίδα (σας συμβουλευόμαστε 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 ανοσοσυμπλόκου (μονοκλωνικό αντιγόνο/αντίσωμα σεσημασμένο με POD) σε κάθε μία κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντάς τις 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. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Ρίξτε 100 µL αραιωμένου ορού και 100 µL ορού ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας
—
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
—
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl) |
| STEP 2 | Ρίξτε 100 µL ανοσοσυμπλόκου σε κάθε 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

Ποιοτικά αποτελέσματα

Αν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από το Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgM.

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.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Τα αποτελέσματα πρέπει να συνεκτιμούνται μαζί με άλλα δεδομένα που προέρχονται από κλινική αξιολόγηση και από άλλες διαγνωστικές αναλύσεις.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 63 οροί που περιείχαν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες όπως:

- Οροί εγκύων γυναικών (n=12)
- IgM Κοκκοϊού (n=3)
- IgM CMV (n=12)
- IgM HSV (n=5)
- IgM VCA (ετερόφιλα) (n=5)
- IgM Ερυθράς (n=5)
- IgM Ιλαράς (n=5)
- IgM Παρωτίτιδας (n=5)
- Ρευματοειδής Παράγοντας (μέχρι 1080 IU/dl) (n=5)
- Χολερυθρίνη (μέχρι 11 mg/dl)(n=5)
- Τριγλυκερίδια (μέχρι 1281 mg/dl) (n=5)
- Οροί με υψηλή αιμόλυση. (n=3).

Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στο τεστ.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν εξωτερικό κλινικό πειραματισμό, αναλύθηκαν 154 δείγματα με το kit μας και παράλληλα με την μέθοδο ρουτίνας.

Οι οροί είχαν χωριστεί σε 5 διαφορετικές ομάδες:

- Ομάδα 1: 56 δείγματα προερχόμενα από ασθενείς που είχαν προσβληθεί πρόσφατα από ανεμοβλογιά.
- Ομάδα 2: 10 δείγματα προερχόμενα από ασθενείς που είχαν προσβληθεί από επαναλοίμωξη, όπως προέκυψε από την ορομετατροπή ή από την αύξηση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων CFT
- Ομάδα 3: 15 δείγματα προερχόμενα από ασθενείς που είχαν προσβληθεί πρόσφατα από λοίμωξη Κυτταρομεγαλοϊού και που περιείχαν IgM αντι-CMV.
- Ομάδα 4: 8 δείγματα θετικά ως προς την λοιμώδη μονοπυρήνωση που χαρακτηρίζονταν από την παρουσία IgG και IgM αντι-VCA και από την απουσία αντισωμάτων αντι-EBNA.

- Ομάδα 5: 65 δείγματα προερχόμενα από τον ευρύ πληθυσμό, 61 εκ των οποίων περιείχαν αντισώματα IgG αντι-Ανεμοβλογιάς.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο τεστ, δείχνει μία συμφωνία μεταξύ τους κατά 99,4% (153/154), με ευαισθησία 100% (63/63) και ειδικότητα 98,8% (90/91).

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά την ανάλυση

Δείγμα	VZC 1 (Αρνητικός< Cut Off)	VZC 2 (Θετικός> Cut Off)	VZC 3 (Θετικός)	Cut Off	Ορός Ελέγχου Θετικός
n (επαναλαμβανόμενες μετρήσεις)	24	24	24	12	12
Ο.Π.	0.115	0.511	1.769	0.292	1.755
CV%	10	5	5	9	6

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

Δείγμα	Index	
	Ο.Π. Δείγματος/Ο.Π. Cut-off	
	Μ. Τιμή	CV%
Ορός Ελέγχου Θετικός	6.1	2
VZC1	0.4	6
VZC2	1.8	16
VZC3	6.9	4

Ακρίβεια μεταξύ παρτίδων

Δείγμα	Index			Μ. Τιμή	CV%
	Παρτίδα 034	Παρτίδα 035	Παρτίδα 036		
Ορός Ελέγχου Θετικός	5.7	5.8	6.1	5.9	4
VZC1	0.3	0.4	0.4	0.4	16
VZC2	1.3	2.0	2.0	1.8	23
VZC3	4.9	6.2	6.5	5.9	15

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-ώχρο). 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 αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφηση	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 αναρρόφηση.
	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. E.H. Wasmuth and W.J. Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
2. M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
3. P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology 25: 2059 (1987).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL VARICELLA IgM

REF 91079 (48 tests) **REF 91089 (96 tests)**

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO POR CAPTURA PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgM ANTI VARICELLA ZOSTER EN SUERO HUMANO, COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL VARICELA.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

Varicela y Herpes Zoster constituyen dos manifestaciones clínicas resultantes de la infección del Virus de la Varicela Zoster (VZV).

La Varicela es una enfermedad altamente contagiosa que procede generalmente desde la infección primaria con el VZV y afecta normalmente a los niños. La infección por VZV durante el embarazo puede causar enfermedades u malformaciones del feto, mientras al término de ésta la infección puede conducir a la muerte del recién nacido.

Herpes Zoster es una enfermedad que afecta principalmente a los adultos y que parece ser causada por una reactivación del virus, que puede permanecer latente para largo tiempo en los ganglios sensorios espinales que siguen de la infección primaria. La infección causa erupciones cutáneas dolorosas a lo largo de la distribución de los nervios afectados.

Los métodos serológicos son los que generalmente se usan para la determinación del estado inmunitario en personas a riesgo (sobretudo los inmunodeprimidos) y la diagnóstico (sea pre- u post-natal) de personas infectadas por VZV.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba para la titulación de IgM anti-Varicela se basa sobre el principio de la captura de estas inmunoglobulinas por los anticuerpos monoclonales anti IgM humanos en la fase sólida. Una subsecuente incubación con el antígeno de la Varicela en un complejo con los anticuerpos monoclonal conjugado a peroxidasa de rábano selecciona los anticuerpos específicos para el antígeno y está revelado por adición del substrato peroxidasa.

Cuando la reacción enzimática está parada por la adición de una solución de ácido sulfúrico el color se vuelve amarillo. El color, que es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero, puede ser leído en un lector para microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 48 determinaciones (REF 91079)
- Reactivos suficientes para 96 determinaciones (REF 91089)

Poner los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 3x2 tiras (REF 91079), 6x2 tiras (REF 91089) recubiertas de anticuerpos humanos monoclonales anti-IgM humanos

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (M 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 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 2.5 mL

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.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

Ag ANTÍGENO Polvo liofilizado x 3 frascos (REF 91079), x 6 frascos (REF 91089)

Contenido: Varicela Zoster Virus parcialmente purificado y no infectivo, debido a un tratamiento con beta-propiolactone en tampón fosfato 0,04 mol/L, pH 7,2 y lactosa.

Preparación: Reconstituir con el volumen de conjugado indicado en etiqueta, mezclando por inversión.

CONJ CONJUGADO 1 x 10 mL (REF 91079); 1 x 18 mL (REF 91089)

Contenido: anticuerpos monoclonales marcados anti-Varicela con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0,05% Y Bronidox 0,02%.

Preparación: Listo para su uso

El Inmunocomplejo tiene que prepararse 45 minutos antes de su uso.

CONTROL IgM - IgM CONTROL NEGATIVO (PF93900) 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°
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidad hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) capaz de dispensar volúmenes en la gama 225-375 µL
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas y puntales de precisión para recoger 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.

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	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
ANTÍGENO RECONSTITUIDO	5 días 2/8°C si reconstituido con conjugado; (-20°C si reconstituido con Wash Buffer. Evitar de congelar/deshelar repetidas veces (ver “precauciones analíticas” n. 1).
SUBSTRATO	hasta la fecha de 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
TAMPÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 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 los 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. **El antígeno reconstituido con el conjugado no es estable después de congelar. En caso de un consumo limitado del antígeno, proceder como sigue: Reconstituir el antígeno en 1/10 del volumen indicado en etiqueta con el Tampón de Lavado listo para su uso (ej. Volumen indicado en etiqueta es 3 ml: reconstituir con 0.3 ml de Tampón de Lavado). Retirar la cantidad necesaria de antígeno para uso inmediato y mezclar con 10 partes de conjugado. Dispensar y congelar el antígeno no utilizado. En el momento del uso, descongelar y mezclar con 10 partes de conjugado.**
2. 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..**
3. 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.
4. 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.
5. Lavar con ácido hidrocórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
6. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
7. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
8. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
9. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
10. 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.
11. 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.
12. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
13. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
14. 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. Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede proveer resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

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

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Wash Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparar el antígeno reconstituyendo el liófilo con el conjugado (volumen indicado en etiqueta), u, en caso de menor gasto del Ag, con Wash Buffer listo para su uso (1/10 del volumen indicado en etiqueta), y después 1/11 en el conjugado.

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 negativo, 2 cut-off y 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 inmunocomplejo a cada pocillo (antígenos/anticuerpos monoclonales etiquetados) 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 Sustrato, 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/calibradores en los pocillos. |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (30'' tiempo de remojo, 300 µl) |
| | - |
| STEP 2 | Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (30'' tiempo de remojo, 300 µl) |
| | - |
| STEP 3 | Añadir 100 µL de Sustrato a cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 15 min. a T.A. |
| | - |
| STEP 4 | Añadir 100 µL de Solución Bloqueante |
| | - |
| | Leer la D.O. a 450 nm dentro de 30 min |

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Quitar 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 Control Positivo debe tener D.O. de por lo menos 1.5 veces el valor del 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 y ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Resultados cualitativos

Si la D.O. de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas.

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

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2 .

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

No-inmune: si la concentración es < 0.8 .

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

12. LIMITACIONES

Los resultados deben ser siempre interpretados junto con otros datos procedentes de evaluación clínica y de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 63 muestras de suero con potenciales interferentes como:

- Sueros procedentes de mujeres en embarazo (n=12)
- Parvovirus IgM (n=3)
- CMV IgM (n=12)
- HSV IgM (n=5)
- VCA IgM (eterófilos) (n=5)
- Rubéola IgM (n=5)
- Factor Reumatóideo (n=8)
- Anticuerpos eterófilos (n=5)
- Sarampión IgM (n=5)
- Paperas IgM (n=5)
- Factor reumatoideo (hasta 1080 UI/dl) (n=5)
- Bilirubina (hasta 11 mg/dl)(n=5)
- Triglicéridos (hasta 1281 mg/dl) (n=5)
- Muestras fuertemente hemolizados (n=3).

En ningún caso se observaron interferencias.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica externa, se analizaron 154 muestras con el kit Diesse en comparación con el método de rutina utilizado en el laboratorio.

Los sueros se dividieron en 5 paneles diferentes:

- Panel 1: 56 muestras procedentes de pacientes con recién infección de varicela
- Panel 2: 10 muestras procedentes de pacientes con reinfección como demostrado por la sueroconversión u por aumento del título del anticuerpo en CFT.
- Panel 3: 15 muestras procedentes de pacientes con recién infección causada por Citomegalovirus, contenente IgM anti-CMV.
- Panel 4: 8 muestras positivas a la mononucleosis infecciosa caracterizadas por la presencia de IgG y de IgM anti-VCA y por la ausencia de anticuerpos anti-EBNA.
- Panel 5: 65 muestras procedentes de la población general, 61 de los cuales contenían anticuerpos IgG anti-Varicela.

Una comparación de la ejecución de los dos kits revela un acuerdo del 99,4% entre los dos (153/154), con una sensibilidad de 100% (63/63) y una especificidad del 98,8% (90/91).

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo

Muestras	VZC 1 (Negativo< Cut Off)	VZC 2 (Positivo> Cut Off)	VZC 3 (Positivo)	Cut Off	Control Positivo
n (replicados)	24	24	24	12	12
D.O.	0.115	0.511	1.769	0.292	1.755
CV%	10	5	5	9	6

Precisión en ensayos

Muestra	Index	
	D.O. Muestra/D.O. Cut-off	
	Media	CV%
Control Pos.	6.1	2
VZC1	0.4	6
VZC2	1.8	16
VZC3	6.9	4

Precisión en lotes

Muestras	Index			Media	CV%
	Lote n. 034	Lote n. 035	Lote n. 036		
Control Positivo	5.7	5.8	6.1	5.9	4
VZC1	0.3	0.4	0.4	0.4	16
VZC2	1.3	2.0	2.0	1.8	23
VZC3	4.9	6.2	6.5	5.9	15

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 pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del 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. REFERENCIAS

- 1.E.H. Wasmuth and W.J. Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
- 2.M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
- 3.P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology 25: 2059 (1987).



PRECAUTIONS D'UTILISATION

ENZYWELL VARICELLA IgM

REF 91079 (48 tests) **REF 91089 (96 tests)**

(Français)

1. UTILISATION

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

2. INTERET CLINIQUE

La Varicelle et l'Herpes Zoster constituent deux manifestations cliniques d'une infection provoquée par le Virus de la Varicelle Zoster (VZV). La varicelle est une maladie très contagieuse qui est généralement provoquée par une infection primaire avec le VZV et les enfants en sont souvent atteints. Pendant la grossesse, l'infection peut provoquer des maladies ou des malformations du fœtus. Si l'infection a lieu à la fin de la gestation, elle peut même aboutir à un avortement.

L'Herpes Zoster est une maladie qui frappe surtout les adultes. Il semble qu'elle soit due à la réactivation du virus qui peut rester latent pendant de longues périodes dans les ganglions sensoriels spinaux après la primo-infection. Cette infection provoque des éruptions cutanées douloureuses tout le long des nerfs impliqués.

On utilise généralement les méthodes sérologiques pour déterminer l'état immunitaire chez les sujets à risque (surtout chez les sujets immunodéprimés) et pour le diagnostic (pré- ou post-natal) des sujets infectés par le VZV.

3. PRINCIPE

Le test pour le dosage des IgM anti-cytomégalo virus est basé sur le principe de la capture de ces immunoglobulines par les anticorps monoclonaux anti-IgM humaines présents sur la phase solide. Une incubation avec l'antigène de la varicelle en lien avec des monoclonaux conjugués à la peroxydase sert à sélectionner les anticorps spécifiques contre l'antigène, détectés par l'ajout du substrat pour la peroxydase.

Quand on interrompt la réaction enzymatique, avec l'ajout d'une solution d'acide sulfurique, la coloration vire à jaune. La couleur dépend de la quantité d'anticorps spécifiques dans le sérum et elle peut être lue avec un lecteur de microplaques.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 48 réactions (REF 91079).
- Le kit permet de réaliser 96 réactions (REF 91089).

Porter les réactifs à température ambiante avant de les utiliser.

MT PLATE MICROPLAQUE 6 x 8 puits (REF 91079), 12x8 puits (REF 91089) sensibilisées avec des anticorps monoclonaux anti-IgM humaines

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (M, 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 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 2.5 mL

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.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 10 mL (REF 91079), 1 x 18 mL (REF 91089)

Composition : Anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox et du liquide ascitique de souris.

Préparation : Prêt à l'emploi. L'immunocomplexe doit être préparé 45 minutes avant l'emploi.

Ag ANTIGENE lyophilisé, x 3 flacons (REF 91079), x 6 flacons (REF 91089)

Composition : Virus de la Varicelle Zoster partiellement purifié et inactivé par traitement au bêta-propiolactone, en tampon phosphate 0.04 mol/L, pH 7.2, et du lactose.

Préparation : Reconstituer avec le volume de conjugué indiqué sur l'étiquette et agiter en renversant.

CONTROL IgM - CONTROLE NEGATIF IgM (PF93900) 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'ouverture 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.
ANTIGENE RECONSTITUE	5 jours à 2/8°C s'il est reconstitué avec le conjugué (-20 °C s'il est reconstitué avec le tampon de lavage). Eviter de congeler/décongeler plusieurs fois – voir l'« Avertissement analytique » n° 1)
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 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 réactifs usages doivent être traités comme 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. **L'antigène reconstitué avec le conjugué n'est pas stable après la congélation. En cas d'utilisation limitée de l'antigène, il est possible de procéder comme il est indiqué ci-dessous : Reconstituer l'antigène dans 1/10 du volume reporté sur l'étiquette avec le tampon de lavage prêt à l'usage (ex. le volume sur l'étiquette est 3 ml : reconstituer avec 0,3 ml de tampon de lavage). Prélever la quantité d'antigène nécessaire à l'exécution du test et la mélanger avec 10 parties de conjugué. Doser et congeler l'antigène restant. Au moment de l'emploi, décongeler et mélanger avec 10 parties du conjugué.**
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorite pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
7. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
8. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
9. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
10. 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.
11. 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.
12. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé, ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
13. L'utilisation du kit avec les instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.

14. 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 ne provoque pas de 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).
- Préparation de l'antigène en reconstituant le lyophilisé avec le conjugué (volume reporté sur l'étiquette). En cas d'utilisation mineure, il est possible de le diluer avec le tampon de lavage (1/10 du volume reporté sur l'étiquette) et puis 1/11 dans le conjugué).

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 les contrôles NON dilués (100 µl/puits) dans une barrette. 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 de l'immunocomplexe (antigène/anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase) 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 l'immunocomplexe dans les puits

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver pendant 30 seconde 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 $\geq 0,2$ à 450 nm et $\geq 0,16$ 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 varicelle.

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.

12. LIMITES DE LA METHODE

Le diagnostic ne doit pas se baser uniquement sur les résultats biologiques, mais il faut tenir compte de l'ensemble des données cliniques et diagnostiques.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

Nous avons testé 63 échantillons contenant des substances potentiellement interférentes :

- Sérum de femmes enceintes (n=12)
- Parvovirus IgM (n=3)
- CMV IgM (n=12)
- HSV IgM (n=5)
- VCA IgM (hétérophiles) (n=5)
- Rubella IgM (n=5)
- Rougeole IgM (n=5)
- Parotidite IgM (n=5)
- Facteur Rhumatoïde (jusqu'à 1080 UI/dl) (n=5)
- Bilirubine (jusqu'à 11 mg/dl) (n = 5)
- Triglycérides (jusqu'à 1281 mg/dl) (n=5)
- Sérums fortement hémolysés (n=3).

Aucune interférence n'a été observée.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

Dans une expérimentation externe, 154 sérums ont été analysés avec cette méthode. Les résultats ont été comparés avec la méthode de routine.

Les sérums ont été divisés en 5 différentes séries :

- Série 1: 56 échantillons provenant de patients qui présentaient une infection de varicelle récente
- Série 2: 10 échantillons provenant de patients ayant eu une réinfection, démontrée par la séroconversion ou par le titre plus élevé d'anticorps en CFT
- Série 3: 15 échantillons de patients ayant une infection récente de Cytomégalo virus, contenant des IgM anti-CMV.
- Série 4: 8 échantillons positifs à la mononucléose infective, caractérisés par la présence d'IgG et IgM anti-VCA et par l'absence d'anticorps anti-EBNA.
- Série 5: 65 échantillons provenant de la population générale, dont 61 contenaient des IgG anti-Varicelle.

La comparaison des deux méthodes démontre un concordance de 99,4 % entre les deux (153/154), avec une sensibilité de 100% (63/63) et une spécificité de 98,8 % (90/91).

15. PRECISION

Précision de l'essai

Echantillon	VZC 1 (Négatif <Cut Off)	VZC 2 (Positif>Seuil)	VZC 3 (Positif)	Seuil	Contrôle Positif
n (réplications)	24	24	24	12	12
D.O.	0.115	0.511	1.769	0.292	1.755
CV %	10	5	5	9	6

Précision entre essais

Echantillon	Indice	
	O.D. Echantillon/O.D. Seuil	
	Moyenne	CV %
Contrôle Pos.	6.1	2
VZC1	0.4	6
VZC2	1.8	16
VZC3	6.9	4

Précision entre lots

Echantillon	Indice			Moyenne	CV %
	Lot n° 034	Lot n° 035	Lot n° 036		
Contrôle Positif	5.7	5.8	6.1	5.9	4
VZC1	0.3	0.4	0.4	0.4	16
VZC2	1.3	2.0	2.0	1.8	23
VZC3	4.9	6.2	6.5	5.9	15

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

1. E.H. Wasmuth and W.J. Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
2. M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
3. P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology 25: 2059 (1987).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL VARICELLA IgM

REF 91079 (48 tests) **REF** 91089 (96 tests)

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Varicella IgM é um método imuno-enzimático para a determinação qualitativa dos anticorpos de classe IgM contra o vírus Varicella Zoster no soro humano, como uma ajuda no diagnóstico de Varicella.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A Varicela e o Herpes Zoster são duas manifestações clínicas que resultam de infecção provocada pelo vírus Varicella Zoster (VVZ).

A varicela, ou catapora, é uma doença altamente contagiosa, que é geralmente uma consequência de infecção primária pelo vírus VVZ e afecta normalmente as crianças. A infecção causada por VVZ durante a gravidez pode provocar doença ou malformação do feto; se ocorrer no fim da gravidez pode conduzir à morte do neonato.

O Herpes Zoster é uma doença que afecta essencialmente os adultos e parece ser causada por uma reactivação do vírus, que pode permanecer latente durante longos períodos nos gânglios sensoriais da espinal-medula, após ocorrência de infecção primária. A infecção causa erupções cutâneas dolorosas ao longo do percurso dos nervos afectados.

Adoptam-se normalmente métodos serológicos para se determinar o estado imunitário dos indivíduos em risco (essencialmente doentes imunodeprimidos) e no diagnóstico pré e pós-natal dos indivíduos infectados.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O teste para ensaio de anti-Varicella Zoster IgM é baseado no princípio da captura destas imunoglobulinas por anticorpos monoclonais anti-humanos IgM encontrados na fase sólida. Uma incubação subsequente com antígeno de varicella num complexo com anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase de arborácio (HRP) selecciona os anticorpos IgM específicos para o antígeno e é revelado pela adição do substrato de peroxidase. Quando a reacção enzimática é interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico, forma-se uma coloração amarela. A cor, que é proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra, pode ser lida num leitor de amostras ELISA.

4. CONTEÚDO DO KIT

- Os reagentes são suficientes para 48 determinações (REF 91079)
- Os reagentes são suficientes para 96 determinações (REF 91089)
- **Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

MT PLATE MICROPLACA 6x8 poços (REF 91079), 12x8 poços (REF 91089) cobertos com anticorpos monoclonais IgM anti-humanos.

Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (M 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 1 x 10 mL (REF 91079), 1 x 18 mL (REF 91089)

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com HRP, numa solução tampão fosfatada com fluído ascítico de rato, contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%.

Preparação: Pronto a ser usado sem mais diluição. O imunocomplexo tem de ser preparado 45 minutos antes da sua utilização.

Ag ANTÍGENO (PF91685) Congelado a seco x 3 frascos (REF 91079), x 6 frascos (REF 91089)

Conteúdo: Vírus Varicella Zoster parcialmente purificado, inativado pelo tratamento com Beta-propiolactona, em tampão fosfatado a 0,04mol/L e lactose, pH 7.2.

Preparação: reconstitua com o volume conjugado mostrado na etiqueta, misturando por inversão.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, 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 soros de controlo é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1 x 2.5 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, 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 soros de controlo é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL IgM - CONTROLO NEGATIVO IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Soro humano diluído, 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) 1x 12 mL Pronto a usar **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0,01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3.8).

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.

5. 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	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Soros de controlo	5 semanas a 2/8°C
Conjugado	5 semanas a 2/8°C
Antigénio reconstituído	5 dias a 2/8°C, se reconstituído com conjugado; (-20°C se reconstituído com Tampão de Lavagem. Evite congelar e descongelar repetidamente. Ver “Precauções técnicas” nº 1).
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	pronto a usar, 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 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 atenção apropriada. 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

- **O antígeno reconstituído com conjugado não é estável após a congelação. No caso de um consumo limitado de antígeno, proceda da seguinte forma: Reconstitua o conjugado na proporção de 1/10 do volume indicado no rótulo do Tampão de Lavagem pronto a ser utilizado (ex: volume indicado no rótulo- 3 ml: reconstitua com 0,3 ml de Tampão de Lavagem). Obtenha a quantidade de antígeno necessária para uso imediato e misture com 10 partes de conjugado. Separe em alíquotas e congele o restante antígeno. No momento em que for utilizar, descongele e misture com 10 partes de conjugado.**
- 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 intermutáveis. 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 “sobre” 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 agitadas antes de efectuar o teste. A inactivação por calor não conduz a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.

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

O teste não pode ser executado em 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).
- Prepare o antígeno reconstituindo o pó seco por congelação directamente com o conjugado (volume indicado na etiqueta). No caso de consumo reduzido de Ag, reconstitua com o Tampão de Lavagem pronto a usar (1/10 do volume indicado no rótulo) e, em seguida, com 1/11 no conjugado.

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 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 (300 µl, com 30 segundos de tempo de enxaguamento para cada ciclo), adicione 100 µL de imunocomplexo (anticorpos monoclonais do antígeno conjugados com HRP) em cada poço 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 controlos não diluídos nos poços designados.
- M. Pipete 100 µL de amostras diluídas nos poços subsequentes.
- N. Incube durante 45 minutos a 37°C
- O. Lave quatro vezes. (30'' de tempo de enxaguamento; 300 µL)
- P. Adicione 100 µL de imunocomplexo 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 nm dentro de 30 min.

10. VALIDADE DO ENSAIO

O valor do branco deve ser ≤ 0.150 . Subtraia este valor de todas as outras leituras. O valor D.O. do Controlo Directo, quando testado em triplicado, deve estar dentro de 25% do valor médio. Elimine quaisquer valores anómalos e volte a calcular a média. O controlo positivo deve ter uma D.O., pelo menos, 1.5 vezes a do valor Directo. A relação entre Controlo Negativo e Controlo Directo deve ser ≤ 0.6 . A 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 os valores de DO líquidos. Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do Directo. Esta relação é o Índice Directo (COI).

$COI = DO \text{ da Amostra} / DO \text{ Directa}$

A amostra é considerada:

Positiva: quando a relação é > 1.2

Duvidosa: se o COI estiver entre 0.8 e 1.2 ($\pm 20\%$ do Directo)

Negativa: quando a relação é < 0.8 .

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

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos e de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 63 amostras de soro contendo substâncias potencialmente interferentes :

- Soro proveniente de grávidas (n=12)
- IgM de Parvovirus (n=3)
- IgM de CMV (n=12)
- IgM de HSV (n=5)
- IgM (heterofil Ab) de VCA (n=5)
- IgM de Rubéola (n=5)
- IGM de Sarampo (n=5)
- IgM de Papeira (n=5)
- Factor Reumatóide (até 1080 UI/dl) (n=5)
- Bilirrubina (até 11 mg/dl)(n=5)
- Triglicéridos (até 1281 mg/dl) (n=5)
- Amostras fortemente hemolizadas (n=3).

Nenhuma interferência foi notada em qualquer caso.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE RELATIVA

Num ensaio externo, 154 amostras foram analisadas com o presente kit em paralelo com o método de rotina usado no laboratório.

As amostras foram divididas em 5 painéis diferentes.

- Painel 1: 56 amostras de doentes com infecção de varicela recente
- Painel 2: 10 amostras com re-infecção demonstrada por conversão do soro ou por um aumento no título do anticorpo em CFT.
- Painel 3: 15 amostras provenientes de doentes com infecção recente causada por Citomegalovírus, contendo IgM anti-CMV.
- Painel 4: 8 amostras que foram positivas para infecção por mononucleose, caracterizada pela presença de IgG e IgM anti-VCA e pela ausência de anticorpos anti-EBNA.
- Painel 5: 65 amostras colhidas entre a população em geral, 61 das quais contendo IgG anti-Varicela.

Uma comparação ao desempenho dos dois kits mostra uma concordância de 99,4% entre os dois (153/154). A sensibilidade relativa foi de 100% (63/63) e a especificidade relativa foi de 98,8% (90/91).

15. PRECISÃO

Intra-ensaio

Amostra	VZC 1 (Negativo< Directo)	VZC 2 (Positivo> Directo)	VZC 3 (Positivo)	Directo	Controlo Positivo
n (replicações)	24	24	24	12	12
D.O.	0.115	0.511	1.769	0.292	1.755
CV%	10	5	5	9	6

Entre ensaios

Amostra	Índice	
	Média	CV%
Controlo Positivo	6.1	2
VZC1	0.4	6
VZC2	1.8	16
VZC3	6.9	4

Entre lotes

Amostra	Índice Directo			Média	CV%
	Lote nº 034	Lote nº 035	Lote nº 036		
Controlo Positivo	5.7	5.8	6.1	5.9	4
VZC1	0.3	0.4	0.4	0.4	16
VZC2	1.3	2.0	2.0	1.8	23
VZC3	4.9	6.2	6.5	5.9	15

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. BIBLIOGRAFIA

1. E.H. Wasmuth and W.J Miller: J. Med. Virology 32: 189 (1990).
2. M.L. Landry, S.D. Cohen, D. Mayo, C. Fong, W. Andiman: J. Clin. Microbiology 25: 832 (1987).
3. P. Larussa, S. Steinberg, et al. J. Clin. Microbiology

	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 (SIENA) Italy
Tel. 0577-587111