ENZYWELL

RUBELLA IgG AVIDITY

REF 91095 (24 tests)

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

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente **Changes introduced in the current revision** **Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση** **Cambios introducidos en la revisión actual** **Modifications apportées à la révision courante**	**12**

CE
0123

INDICE / INDEX / ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / /ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE /ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST
13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES
14. PRECISIONE / PRECISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION
15. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / "ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES
16. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY

REF 91095 **(Italiano)**

1. UTILIZZAZIONE

METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'AVIDITÀ DEGLI ANTICORPI IgG ANTI VIRUS DELLA ROSOLIA NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA RUBELLA VIRUS.

2. INTRODUZIONE

Il virus della Rosolia provoca nell'uomo una malattia contagiosa molto comune caratterizzata da esantema diffuso. Il decorso è generalmente breve e privo di complicazioni.
Se la malattia è invece contratta durante la gravidanza ci sono conseguenze per il feto in quanto il virus è teratogeno e provoca gravi malformazioni specialmente durante il primo mese di gestazione.
Per questo motivo è essenziale conoscere lo stato immunitario della paziente prima dell'inizio della gravidanza in quanto si può procedere alla vaccinazione o, se questa è impossibile, al frequente monitoraggio per osservare l'eventuale sieroconversione.
Alcune volte non basta la sola individuazione di anticorpi IgM, poiché la presenza di questi anticorpi può essere dovuta a persistenza delle IgM o reinfezione asintomatica da Rosolia, senza presentare rischi per il feto.
Per questo risulta utile dosare l'avidità degli anticorpi IgG in quanto è stato dimostrato che questa è bassa nella fase acuta ed aumenta con il passare del tempo.
Per questo la presenza di anticorpi a bassa avidità è indice di infezione recente o in atto.
L'avidità delle IgG nel siero può essere dosata con questo kit ELISA.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
L'antigene da Virus della Rosolia purificato ed inattivato viene legato alla fase solida. Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. Il campione viene deposto in due pozzetti (o in quattro per il test in duplicato) e lasciato in incubazione. Dopo lavaggio della fase solida, in un pozzetto viene posto il Tampone Avidity mentre nell'altro soluzione di lavaggio. Il primo tampone provocherà la dissociazione del legame tra antigene ed anticorpo e questa sarà proporzionale alla avidità degli anticorpi. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con l'enzima Perossidasi di rafano.
Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato specifico per l'enzima.
Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame rimasti legati all'antigene legato alla fase solida. Il rapporto tra la densità ottica del pozzetto dove è stato incubato il tampone Avidity e quella dove è stato incubato il tampone di lavaggio è espresso in percentuale e costituisce la misura dell'avidità del siero in esame verso il virus della Rosolia.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 24 determinazioni.
- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA SENSIBILIZZATA CON VIRUS DELLA ROSOLIA (COLORATE IN ROSSO) 3 x 16 pozzetti

Uso: Aprire l'involucro delle strips dalla parte opposta al codice (R seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto ed inserire i pozzetti necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONJ CONIUGATO 1 x 12 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi, in tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL CONTROLLO DI AVIDITÀ 1 x 2.5 mL

Contenuto: Siero umano contenente IgG anti Rubella in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

AVIDITY BUF TAMPONE AVIDITY 1 x 10 mL
Contenuto: Urea in soluzione salina tamponata contenente fenolo (0.05%) e Bronidox (0.02%), pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima dell'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte, contenente Brij 0.5% p/v.
Preparazione: Diluire 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 1 x 12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Tetrametilbenzidina ed H_2O_2 stabilizzati in tampone citrato pH 3.8.
Stabilità: Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato a 2/8°C.

H_2SO_4 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Soluzione di H_2SO_4 0.3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).
BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre(lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD ≥ 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette 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
SIERI DI CONTROLLO	5 settimane 2/8°C
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
TAMPONE AVIDITY	fino alla scadenza a 2/8°C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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) Il controllo contiene come conservante 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 pulito, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**

   Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'utilizzo del kit su strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.

13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
    - installazione e requisiti particolari
    - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
    - specifiche del produttore e performance dello strumento
    - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a –20°C 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 può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.
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 H_2O).

Lasciare un pozzetto vuoto per il bianco. Diluire i campioni 1:301 dispensando 5 µL di siero in 1,5 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito in almeno due pozzetti, e 100 µl di Siero di Controllo in duplicato. Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 60' a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30" ciascuno (300 µL), dispensare in un pozzetto sia dei campioni che dei controlli il Wash Buffer e nell'altro il Tampone Avidity e incubare per 10' a 37°C. Aspirare il tampone ed eseguire 4 lavaggi della durata di 30". Si aggiungono 100 µl di coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare 45' 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., compreso il bianco. Dopo 15' a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µl di Stop Solution. Si legge la DO a 450 nm o a 450/620 nm entro 30'.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

STEP 1	Mettere 100 µL di siero diluito/ controllo in doppio nei pozzetti dello strip.
	-
	Incubare 60 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µL)
	-
STEP 2	Per ciascun campione/controllo distribuire in un pozzetto mettere 100 µl di Wash Buffer e in un pozzetto 100 µl di Tampone Avidity, incubare 10' a 37°C.
	-
	Lavare 4 volte (300 µL)
	-
STEP 3	Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto
	-
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte
	-
STEP 4	Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto compreso il bianco
	-
	Incubare 15 min. a t.a.
	-
STEP 5	Aggiungere 100 µL di Stop Solution
	-
	Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

La O.D. del Bianco deve essere ≤ 0.150.
Il controllo nei pozzetti incubati con il Wash Buffer deve riportare un valore di O.D. > 0.500.
La percentuale di avidità del controllo deve essere maggiore del 45%, calcolata come riportato nel paragrafo "Interpretazione del Test".

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

La percentuale di avidità dei campioni è espressa e calcolata facendo il rapporto tra le densità ottiche trovate nel pozzetto con Tampone Avidity e quello con Wash Buffer sottratte entrambi del valore del bianco.

$$\frac{\text{O.D con Tampone Avidity – O.D bianco}}{\text{O.D con Wash Buffer – O.D. bianco}} \times 100 = \%\ \text{di avidità}$$

Quando questo rapporto è maggiore del 45%, indica la presenza di IgG anti-Rosolia ad alta avidità; quando è minore del 35% indica la presenza di IgG anti-Rosolia a bassa avidità. Quando la percentuale è compresa tra 35% e 45% siamo di fronte a IgG anti-Rosolia a media avidità (Borderline). In questo caso l'interpretazione del test è dubbia.
Il calcolo può essere effettuato solo su campioni che hanno una O.D. del pozzetto lavato con Wash Buffer ≥ 0.400.

Avvertenza:
Se la O.D. del pozzetto di riferimento è superiore a 2.000 ripetere il test diluendo 1/1000.
Se la O.D. del pozzetto di riferimento è < 0.400 ripetere il test diluendo il campione 1/101.

Nel caso in cui il risultato sia a media avidità ripetere il test.
In ogni caso è consigliabile ripetere il test dopo 2-3 settimane in modo da valutare la eventuale variazione dell'avidità.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La presenza di IgG ad alta avidità, anche se non esclude la possibilità che vi sia stata una infezione recente, è fortemente indicativa di una Rosolia avvenuta almeno 4 mesi prima.
Al contrario la presenza di IgG a bassa avidità è fortemente indicativa di una Rosolia avvenuta nei 3 mesi precedenti.
Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti dalla storia del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13 SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati testati 115 campioni con il kit Diesse ed in parallelo con uno della concorrenza ; in tutti i campioni erano stati determinati gli anticorpi specifici IgG e IgM.
I campioni erano suddivisi nei seguenti gruppi:

1. 54 appartenevano a soggetti con storia di recente infezione di Rubella (44 positivi in IgM, 4 dubbi e 6 negativi).
2. 41 campioni di donne gravide
3. 20 campioni di donne in età fertile positive alle IgG e negative alle IgM.

Il kit Diesse identifica 104 casi su 115 con una correlazione del 90% quando comparato all'altro metodo.

14. PRECISIONE

Tab.1 Precisione nella prova (n=6)

Campione	% media avidità	D.S.	CV%
Bassa Avidità	14	1	8
Alta Avidità	91	4	4

Tab.2 Precisione tra prove

Campione	% media avidità	D.S.	CV%
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	33

15. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBLI 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 istruzioni per l'uso 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	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.

16. BIBLIOGRAFIA

1. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
2. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
3. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY

REF 91095 **(English)**

1. INTENDED USE

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Rubella virus causes a very common infectious disease in humans, accompanied by a typical diffused rash. The course of the illness is generally short and without complications. However, it is harmful for the fetus if contracted during pregnancy, because the virus is teratogenic and may cause very serious malformations especially during the first month of pregnancy. It is therefore essential to determine the patient's state of immunity before the start of pregnancy, if possible, in order to perform vaccination or, if this is impossible, to monitor the course of the pregnancy to observe whether seroconversion occurs.
Sometimes it is not sufficient to test for IgM antibodies, as the presence of this class may be due to the persistence of IgM or asymptomatic reinfection by Rubella, without risk for the fetus.
For this reason it is useful to assay the avidity of the IgG antibodies, in as far as it has been demonstrated that avidity is low in the acute phase of infection and increases over a period of time. The presence of low avidity antibodies is therefore an indication of a recent or current infection. The avidity of IgG antibodies in the serum can be assayed with this ELISA kit.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
The purified and inactivated Rubella virus antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum. The sample is placed in two wells (or in four wells if the test is performed in duplicate) and left to incubate.
After washing of the solid phase, the Avidity Buffer is placed in one well and the rinsing buffer in the other. The avidity buffer will cause dissociation of the antigen/antibody bond, proportional to the avidity of the antibodies. After washings to eliminate the proteins that have not reacted, incubation is performed with the conjugate composed of anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase HRP.
The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate specific for the enzyme is added.
The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample still bound to the antigen. The ratio between the OD of the well containing the Avidity buffer and that containing the Wash Buffer is expressed as a percentage and gives the degree of avidity of the serum sample for the Rubella antigen.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 24 determinations.
- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE COATED WITH RUBELLA VIRUS (COLOURED IN RED) 3 x 16 wells
Use: open the package at the opposite end from the code (R followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and wells to be used from the foil package, and place the unused wells in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONJ CONJUGATE 1x12 mL
Contents: anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL AVIDITY CONTROL 1 x 2.5 mL
Contents: Human serum containing anti-Rubella IgG antibodies diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

AVIDITY BUF AVIDITY BUFFER 1 x 10 mL
Contents: Urea in saline buffered solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before use.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% w/v.
Preparation: dilute 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
To be used to dilute samples.
Contents:Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE 1 x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide stabilised in citrate buffer, pH 3.8.

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
H2SO4 0.3 M, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).
POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.
- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 nm or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionized 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 serum	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Avidity Buffer	up to the expiry date at 2/8°C
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

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

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
   a) The Wash Buffer contains detergents
   b) The conjugate contains phenol
   c) The substrate is acid
   d) The Control contains Sodium Azide 0.09% as preservative which may react with copper and lead in plumbing to form potentially explosive 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 Soution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature**.**
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents sbould be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for excusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO_2 incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. The use of the kit with automated instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
    - installation and particular requisites
    - operating principles, instructions, precautions and risks
    - manufacturer's specifications and instrument performance
    - servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at –20°C and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted

samples must be carefully shaken before performing the test. Heat inactivation can 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

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Leave one well empty for the test blank. Dilute samples 1:301 distributing 5 µL of serum into 1.5 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample in at least two wells, and 100 µl of Control Serum in duplicate. Wells are covered with protective film and incubated for 60 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), dispense Wash Buffer in one well of the serum samples and of the controls and Avidity Buffer in the other, and incubate for 10' at 37°C. Aspirate the buffer and perform 4 washings for 30 seconds each. Add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well, including the blank.
After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.
The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1	Place 100 µL of diluted sample/control in duplicate in the wells of the strips.
	-
	Incubate for 60 min. at 37°C
	-
	Wash 4 times (30 seconds each, 300 µL)
	-
STEP 2	For each sample and control, place 100 µl of Wash Buffer in one well and 100 µl of Avidity buffer in the other; incubate for 10' at 37°C
	-
	Wash four times (30 seconds each, 300 µL)
	-
STEP 3	Add 100 µL of conjugate to each well
	-
	Incubate for 45 min. at 37°C
	-
	Wash 4 times
STEP 4	Add 100 µL of Substrate to each well including the blank
	-
	Incubate for 15 min. at R.T.
	-
STEP 5	Add 100 µL of Stop Solution
	-
	Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. VALIDATION OF THE TEST

The O.D. of the Blank must be ≤0.150.
The control in the wells incubated with the Wash Buffer must give an OD value > 0.500.
The percentage of avidity of the control must be higher than 45%, calculated as reported at paragraph “Interpretation of the Results”.

11. INTERPRETATION OF RESULTS

The percentage of avidity of the samples is expressed and calculated using the ratio between the O.D. found in the wells containing Avidity buffer and those with Wash Buffer, subtracting the value of the blank.

$$\frac{\text{O.D. with Avidity Buffer} - \text{O.D. blank}}{\text{O.D. with Wash Buffer} - \text{O.D. blank}} \times 100 = \% \text{ of avidity}$$

A ratio over 45% indicates the presence of high avidity anti-Rubella IgG; when it is lower than 35%, it indicates the presence of low avidity anti-Rubella IgG. If the percentage is between 35 and 45%, there is a medium degree of anti-Rubella IgG avidity (Borderline). In this case the interpretation of the test is doubtful.
The calculation can only be performed on samples which give an O.D. ≥ 0.400 in the well washed with Wash Buffer.

Warning:
If the O.D. of the reference well is higher than 2.000 repeat the test diluting 1/1000.
If the O.D. of the reference well is < 0.400 repeat the test diluting the samples 1/101.

Repeat the test in case of a medium avidity result.
It is advisable to repeat the test after 2-3 weeks, in order to evaluate a possible variation of percentage of avidity.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The presence of high avidity IgG, even if it does not exclude the possibility of a recent infection, is strongly indicative of a Rubella infection contracted 4 months earlier at least.
On the contrary, the presence of low avidity IgG is strongly indicative of a Rubella infection contracted during the last 3 months.
The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of the case history or other diagnostic procedures.

13. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

115 samples were tested with the Diesse kit and in parallel with another commercial test; all the samples had been studied for the presence of specific IgG and IgM.
The samples were divided into the following groups:

1) 54 from subjects with a recent history of Rubella infection (44 positive in IgM, 4 doubtful and 6 negative).
2) 41 samples from pregnant women.
3) 20 samples from fertile women, positive for IgG and negative for IgM.

The Diesse kit identified 104 cases out of 115 with a correlation of 90% in comparison to the other method.

14. PRECISION

Tab.1 Precision in run (n=6)

Sample	% average avidity	D.S.	CV%
Low avidity	14	1	8
High avidity	91	4	4

Tab.2 Precision between runs

Sample	% average avidity	D.S.	CV%
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	33

15. TROUBLE SHOOTING

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.

16. REFERENCES

1. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
2. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
3. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY

REF **91095** **(Ελληνικά)**

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ "AVIDITY" ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός της Ερυθράς προκαλεί στον άνθρωπο μία πολύ κοινή μεταδοτική νόσο κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι ένα διάχυτο εξάνθημα σε όλο το σώμα. Η διάρκειά της είναι γενικά σύντομη και δεν παρουσιάζει επιπλοκές.
Αν όμως η νόσος παρουσιαστεί κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης υπάρχουν επιπτώσεις για το έμβρυο επειδή ο ιός είναι τερατογόνος και μπορεί να προκαλέσει ατελείς διαπλάσεις βαριάς μορφής, ειδικά κατά τον πρώτο μήνα της κύησης.
Γι' αυτό τον λόγο είναι απαραίτητο να είναι γνωστή η ανοσολογική κατάσταση της ασθενούς πριν από την εγκυμοσύνη επειδή έτσι μπορεί να γίνει εμβολιασμός ή, αν αυτό δεν είναι δυνατό, μία συνεχής παρακολούθηση για να ανιχνευθεί μία πιθανή ορομετατροπή.
Σε μερικές περιπτώσεις η ανίχνευση μόνο των αντισωμάτων IgM, δεν είναι αρκετή επειδή η παρουσία αυτών των αντισωμάτων μπορεί να οφείλεται σε παραμένοντα IgM ή σε ασυμπτωματική επαναλοίμωξη από Ερυθρά, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για το έμβρυο.
Γι' αυτό έχει σημασία ο προσδιορισμός του βαθμού της "avidity" (ισχύς δεσμού αντιγόνου-αντισώματος) των IgG επειδή έχει αποδειχθεί ό,τι αυτή είναι χαμηλή κατά την οξεία φάση και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.
Έχει αποδειχθεί ό,τι η παρουσία αντισωμάτων χαμηλής "avidity" είναι ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης, ή σε εξέλιξη.
Η "avidity" των IgG στον ορό, μπορεί να προσδιοριστεί με αυτό το κιτ ELISA.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Το αντιγόνο, αποτελούμενο από Ιό της Ερυθράς κεκαθαρμένο και αδρανοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση. Μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό, οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο. Το δείγμα τοποθετείται σε δύο κυψελίδες (ή σε τέσσερις για τα τεστ εις διπλούν) και αφήνεται στην επώαση. Μετά την έκπλυση της στερεάς φάσης, στη μία κυψελίδα τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα "Avidity" ενώ στην άλλη διάλυμα έκπλυσης. Το πρώτο ρυθμιστικό διάλυμα θα προκαλέσει τον διαχωρισμό του δεσμού αντιγόνου και αντισώματος και αυτός θα είναι ανάλογος της "avidity" των αντισωμάτων. Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgG σεσημασμένα με το ένζυμα υπεροξειδάσης ραφανίδων.
Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το ειδικό υπόστρωμα για το ένζυμο.
Το χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό συνδεδεμένα με το αντιγόνο που έχει συνδεθεί με την στερεά φάση. Ο λόγος μεταξύ της οπτικής πυκνότητας της κυψελίδας που έχει επωασθεί το ρυθμιστικό διάλυμα Avidity και της κυψελίδας που έχει επωασθεί το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, είναι εκφρασμένο σε εκατοστιαίο ποσοστό και αποτελεί τον βαθμό της "avidity" του υπό εξέταση ορού έναντι του αντιγόνου του ιού της Ερυθράς.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 24 τεστ.
- **Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΕ ΙΟ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΑΣ (ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΕΡΥΘΡΟΥ) 3 x 16 κυψελίδες.

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών (strips) από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (R ακολουθούμενο από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε την βάση και τοποθετήστε όσες ταινίες χρειάζονται. Βάλτε 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.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1 x 12 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-IgG σεσημασμένων με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον διάλυση.

CONTROL ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ "AVIDITY" 1 x 2.5 mL
Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός με IgG αντι Ερυθράς σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον διάλυση.

AVIDITY BUF ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ "AVIDITY" 1 x 10 mL
Περιεχόμενο: Ουρία σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα που περιέχει φαινόλη (0.05%) και Bronidox (0.02%), έτοιμη για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν από την χρήση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X 1 x 100 mL
ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ
Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5% p/v.
Προετοιμασία: Αραιώστε 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 1 x 12 mL Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη και H_2O_2 σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3.8.
Σταθερότητα: Το προϊόν παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του αν διατηρηθεί σε 2/8°C.

H_2SO_4 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Διάλυμα H_2SO_4 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, 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
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
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ "AVIDITY"	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°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 αντιδραστηρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

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

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ό,τι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
    Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χείλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια

πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO_2.

23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ό,τι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ό,τι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
    - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφέςi
    - 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 καταψύξτε 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 H_2O)

Αφήστε μία κυψελίδα για το τυφλό δείγμα. Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:301 ρίχνοντας 5 µl ορού σε 1,5 mL διαλύτη, μοιράστε 100 µl από κάθε αραιωμένο δείγμα σε δύο κυψελίδες τουλάχιστον και 100 µl Διαλύματος Ελέγχου εις διπλούν. Καλύψτε τις κυψελίδες με προστατευτικό κάλυμμα και επωάστε για 60' σε 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις διάρκειας 30" η κάθε μία (300 µL), ρίξτε σε μία κυψελίδα, τόσο των δειγμάτων όσο και των διαλυμάτων ελέγχου, το Wash Buffer και στο άλλο το Ρυθμιστικό Διάλυμα "Avidity" και επωάστε για 10' σε 37°C. Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα με αναρρόφηση και κάνετε 4 εκπλύσεις των 30". Προσθέστε 100 µl συζυγούς σε κάθε κυψελίδα και επωάστε και πάλι για 45' στους 37°C, σκεπάζοντας και πάλι τις κυψελίδες με το προστατευτικό κάλυμμα. Κάνετε και πάλι 4 εκπλύσεις, όπως περιγράφηκε προηγούμενα και στη συνέχεια προσθέστε το Υπόστρωμα 100 µl/κυψελίδα, και σε εκείνη του τυφλού δείγματος. Μετά από 15' σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 µl Stop Solution. Διαβάζετε την Ο.Π. στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30'.

9. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

STEP 1	Βάλτε 100 µl di αραιωμένου δείγματος /διαλύματος ελέγχων εις διπλούν στις κυψελίδες της ταινίας.
	-
	Επωάστε 60 λεπτά στους 37°C
	-
	Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µL)
	-
STEP 2	Για κάθε δείγμα/ διάλυμα ελέγχου, ρίξτε σε μία κυψελίδα 100 µl Wash Buffer και σε μία άλλη κυψελίδα 100 µl Ρυθμιστικό Διάλυμα Avidity, και επωάστε για 10' στους 37°C.
	-
	Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µL)
	-
STEP 3	Ρίξτε 100 µl συζυγούς σε κάθε κυψελίδα
	-
	Επωάστε 45 λεπτά στους 37°C
	-
	Κάνετε 4 εκπλύσεις
	-

STEP 4 Ρίξτε 100 µl Υποστρώματος σε κάθε μία κυψελίδα, συμπεριλαμβανομένης και εκείνης του τυφλού

-

Επωάστε για 15’ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

-

STEP 5 Προσθέστε 100 µl Stop Solution

-

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

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Η Ο.Π. του τυφλού δείγματος πρέπει να είναι ≤ 0.150.
Ο ορός ελέγχου στις κυψελίδες που έχουν επωαστεί με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) πρέπει να έχει Ο.Π. > 0.500.
Το ποσοστό avidity του ορού ελέγχου πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 45%, εφόσον έχει υπολογιστεί όπως περιγράφεται στην ενότητα «Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας».

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Το ποσοστό avidity των δειγμάτων εκφράζεται και υπολογίζεται από το λόγο οπτικής πυκνότητας της κυψελίδας με ρυθμιστικό διάλυμα Avidity και της κυψελίδας με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, αφού αφαιρεθεί η τιμή τυφλού δείγματος και από τις δύο αυτές τιμές.

$$\frac{\text{Ο.Π. ρυθμιστικού διαλύματος Avidity – Ο.Π. τυφλού}}{\text{Ο.Π. ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης – Ο.Π. τυφλού}} \times 100 = \%\ \text{Avidity}$$

Αν αυτός ο λόγος είναι μεγαλύτερος από 45%, υποδεικνύει παρουσία IgG έναντι του ιού της ερυθράς με υψηλή avidity, ενώ όταν είναι μικρότερος από 35% υποδεικνύει παρουσία IgG έναντι του ιού της ερυθράς με χαμηλή avidity. Όταν το ποσοστό είναι μεταξύ 35% και 45%, υποδεικνύεται παρουσία IgG έναντι του ιού της ερυθράς μέτριας avidity (οριακό). Σε αυτή την περίπτωση, το αποτέλεσμα της δοκιμασίας θεωρείται διφορούμενο.
Ο υπολογισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο για δείγματα που έχουν Ο.Π. στην κυψελίδα που έχει εκπλυθεί με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ≥ 0.400.

Προειδοποίηση:
Αν η Ο.Π. της κυψελίδας αναφοράς είναι μεγαλύτερη από 2.000, επαναλάβετε τη δοκιμασία αραιώνοντας κατά 1/1000.
Αν η Ο.Π. της κυψελίδας αναφοράς είναι < 0.400, επαναλάβετε τη δοκιμασία αραιώνοντας το δείγμα κατά 1/101.

Αν το αποτέλεσμα υποδεικνύει μέτρια avidity, επαναλάβετε τη δοκιμασία.
Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται να επαναλάβετε τη δοκιμασία μετά από 2-3 εβδομάδες, ώστε να εκτιμηθεί ενδεχόμενη μεταβολή της avidity.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Η παρουσία IgG υψηλής λειτουργικής συγγένειας (avidity), παρά το γεγονός ότι δεν αποκλείει πρόσφατη λοίμωξη, αποτελεί ισχυρή ένδειξη λοίμωξης από ερυθρά τουλάχιστον 4 μήνες πριν. Αντιθέτως, η παρουσία IgG χαμηλής λειτουργικής συγγένειας αποτελεί ισχυρή ένδειξη λοίμωξης από ερυθρά τους 3 προηγούμενους μήνες.
Το αποτέλεσμα του τεστ πρέπει ωστόσο να συνεκτιμηθεί μαζί με τα δεδομένα που προέρχονται από το ιστορικό του ασθενή ή/και από άλλες διαγνωστικές αναλύσεις.

13 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 115 δείγματα με το κιτ Diesse και παράλληλα και με ένα ανταγωνιστικής εταιρείας. Σε όλα τα δείγματα είχαν ανιχνευθεί αντισώματα IgG και IgM.
Τα δείγματα είχαν διαιρεθεί στις παρακάτω ομάδες:

1. 54 προέρχονταν από ασθενείς που είχαν προσβληθεί πρόσφατα από την Ερυθρά.(44 θετικά ως προς τα IgM, 4 αμφίβολα και 6 αρνητικά).
2. 41 δείγματα εγκύων γυναικών
3. 20 δείγματα γυναικών σε ηλικία αναπαραγωγής θετικά ως προς τα IgG και αρνητικά ως προς τα IgM.

Το kit Diesse καθόρισε 104 δείγματα στα 115 με ένα συσχετισμό στα 90% συγκριτικά με την άλλη μέθοδο

14. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Πίν.1 Ακρίβεια κατά την ανάλυση (n=6)

Δείγμα	% Μέσης "Avidity"	D.S.	CV%
Χαμηλή "Avidity"	14	1	8
Υψηλή "Avidity"	91	4	4

Πίν.2 Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

Δείγμα	% Μέσης "Avidity"	D.S.	CV%
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	33

15. 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. Επαναλάβατε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε των κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβατε 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

16. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

4. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
5. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
6. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).

INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY

REF 91095 **(Español)**

1. INDICACIONES

MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA AVIDEZ DE LOS ANTICUERPOS IgG ANTI RUBELLA EN SUERO HUMANO.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El virus de la Rubéola provoca en los seres humanos una enfermedad contagiosa muy común caracterizada por sarpullido difundido. El curso es generalmente breve y sin complicaciones.
Si la enfermedad se contrae durante el embarazo hay consecuencias para el feto ya que el virus es teratogénico y provoca graves malformaciones especialmente durante el primer mes de dicho embarazo.
Por esta razón es importante determinar el estado inmunitario de la paciente antes de comienzos del embarazo en cuanto se puede proceder a la vacunación, al frecuente control para observar la eventual sueroconversión.
A veces la determinación de anticuerpos IgM no es suficiente, ya que la presencia de dichos anticuerpos puede ser debida a persistencia de las IgM o a una reinfección asintomática por Rubella sin riesgo para el feto.
Por esta razón es importante la titulación de los anticuerpos IgG por avidez en cuanto se ha demostrado que ésta es baja en la fase aguda y aumenta con el tiempo. Se ha demostrado que una baja titulación de anticuerpos por avidez es indicativo de infección en el recién nacido o infección actual.
La avidez de las IgG en suero humano puede titularse con este kit ELISA.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
El antígeno, constituido por Rubella parcialmente purificado e inactivo, está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno. La muestra se pone en dos pocillos (o en cuatro para la doble prueba) y dejada en incubación.
Después del lavado de la fase sólida, se pone en un pocillo el Tampón desasociante, mientras en el otro se pone la solución de lavado. El primer tampón provoca la disociación de la unión entre antígeno y anticuerpo, y esta será proporcional a la avidez de los anticuerpos. Después de varios lavados para eliminar las proteinas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa HRP.
El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato específico por el enzima. El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero, unidos al antígeno unido a la fase sólida. La relación entre la densidad óptica del pocillo donde se incubó el tampón desasociante y la de donde se incubó el tampón de lavado está expresa en porcentaje y constituye la medida de la avidez del suero examinado hacia el antígeno Rubella.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 24 determinaciones
- Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 3x16 pocillos recubiertos de antígenos RUBELLA (EN COLOR ROJO)
Uso: Abrir el envase de las tiras desde el lado opuesto del código (R seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte e insertar las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONJ CONJUGADO 1x12 mL
Contenido: anticuerpos monoclonales anti IgG humanos marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CONTROL CONTROL AVIDEZ 1 x 2.5 mL

Contenido: Suero humano que contiene IgG anti Rubella en una solución fosfato tamponada 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica 0,09%, líquido. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

AVIDITY BUF TAMPÓN AVIDITY 1 x 10 mL
Contenido: Urea en solución salina tamponada que contiene fenol (0.05%) y Bronidox (0.02%), lista para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5% p/v.
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 1 x 12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno estabilizados en tampón citrato pH 3,8.

H_2SO_4 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Solución de H_2SO_4 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).
BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS
- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm, con linealidades hasta OD ≥ 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volumenes entre 225-375 µL
- Agua destilada o desionizada
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución
- Material de laboratorio: cubetas, cilindros.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C.
La fecha de caducidad está impresa en cada componente y en la etiqueta externa 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 busta de plástico
SUERO DE CONTROL	5 semanas 2/8°C
CONJUGADO	5 semanas 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C
TAMPÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
TAMPÓN AVIDITY	hasta la caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la 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, segun disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por via 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 substrato es ácido
    d) Los controles contienen Ázida Sódica (0.09%) como conservante 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 1hora 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 otros residuos líquidos se deben disinfectar 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 se que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada . Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos . No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta**. **Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C o por encima de 39°C.**Abrir el envase que contiene las tiras después de por lo menos media hora a temperatura ambiente.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" (“efecto filo”) que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador**.** Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes
    - instalación y requisitos específicos
    - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
    - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
    - mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a –20ºC. La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso. La inactivación al calor puede dar resultados erróneos. La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación micróbiana que conduce a resultados erróneos. No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO DEL TEST

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco. Diluir las muestras 1:301 poniendo 5µL de suero en 1.5 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida por lo menos en dos pocillos, y 100 µL de Suero de Control en doble prueba. Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 60 minutos a 37°C. Después de 4 lavados, cada uno de 30" (300 µL), dispensar Solución De Lavado en un pocillode las muestras de suero y en el otro el Tampón Avidez e incubar 10' a 37°C.

Aspirar el tampón y ejecutar 4 lavados, cada uno de 30". Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo, incluso el blanco.

Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.

Leer la (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/controles en doble prueba en los pocillos.

-

Incubar 60 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (30" cada uno, 300 µl)

STEP 2 Por cada muestra/control distribuir en un pocillo 100 µL de solución de lavado y en un pocillo 100 µL de tampón Avidez, incubar 10' a 37°C.

- Lavar 4 veces (30" cada uno, 300 µl)

STEP 3 Añadir 100 µL de Conjugado a cada pocillo

-

Incubar 45 min. a 37°C.

-

- Lavar 4 veces

STEP 4 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo incluso el blanco

-

Incubar 15 minutos a T.A

STEP 5 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-

Leer la DO a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

El blanco de la O.D. debe ser ≤ 0.150.

El control en los pocillos incubados con la solución de lavado debe llevar un valor de O.D. > 0.500.

El porcentaje de avidez en el control debe ser mayor del 45%, calculada según lo indicado en el párrafo "Interpretación de los Resultados".

11. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El porcentaje de avidez de las muestras se exprime y se calcula con la relación entre las densidades ópticas encontradas en el pocillo con Tampón Avidez y las del Tampón de Lavado subtraídas del valor del blanco.

$$\frac{\text{O.D. con Tampón Avidez – O.D. blanco}}{\text{O.D. con Tampón de Lavado – O.D. blanco}} \times 100 = \% \text{ de avidez}$$

Cuando esta relación es mayor del 45%, indica la presencia de anti-Rubella IgG a alta avidez; cuando es menor de 35% indica la presencia de anti-Rubella IgG a baja avidez. Cuando el porcentaje está en el rango 35 y 45% tenemos anti-Rubella IgG avidez media (Borderline). En este caso la interpretación del test es dudosa.
El cálculo puede efectuarse solamente sobre muestras que tienen una O.D. del pocillo lavado con Tampón de Lavado ≥ 0.400.

Advertencia:
En caso de que la O.D. del pocillo de referencia es más de 2.000, repetir la prueba diluyendo 1/1000.
En caso de que la O.D. del pocillo de referencia es < 0.400, repetir la prueba diluyendo la muestra 1/101.

Repetir la prueba en el caso de un resultado de media avidez.
En cualquier caso se aconseja repetir la prueba después de 2-3 semanas, con el fin de evaluar la eventual variación de la avidez.

12. LIMITACIONES

La presencia de IgG de alta avidez, si bien no excluye la posibilidad de que haya habido una infección reciente, es muy indicativa de que la Rubéola se haya tenido por lo menos hace 4 meses.
En cambio, la presencia de IgG de baja avidez indica marcadamente que la infección ha ocurrido en los últimos 3 meses.
El resultado de la prueba tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de la historia del paciente o de otros procedimientos de diagnóstico.

13. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

Se analizaron 115 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial simultáneamente; todas las muestras se detectaron por la presencia de IgG e IgM específicas. .
Las muestras se dividen en los grupos siguientes:

1. 54 procedentes de pacientes con historia de infección reciente por Rubella (44 positivos para IgM, 4 dudosos y 6 negativos).
2. 41 muestras procedentes de mujeres en embarazo.
3. 20 muestras de mujeres fértiles, positivas para IgG e IgM.

El kit Diesse identificó 104 casos sobre 115 con una correlación del 90% en comparación con el otro método.

14. REPRODUCIBILIDAD

Tab.1 Reproducibilidad intra-ensayo (n=6)

Muestra	avidez % media	S.D.	CV%
Baja Avidez	14	1	8
Alta Avidez	91	4	4

Tab. 2 Reproducibilidad entre ensayos y lotes

Muestra	avidez % media	S.D.	CV%
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	33

15. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA Y 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 reactivos que no se hayan añadido. Repetir el test.
	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 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 substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

16. BIBLIOGRAFIA

1. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
2. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
3. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).

INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZYWELL
RUBELLA IgG AVIDITY

REF 91095 **(Français)**

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION DE L'AVIDITE DES ANTICORPS IgG ANTI-RUBEOLE DANS LE SERUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

Le virus de la rubéole provoque une maladie contagieuse très commune chez les hommes, caractérisée par un exanthème diffus. En général, le cours de la maladie est bref et sans complications. Toutefois, si on la contracte pendant la grossesse, il y a des conséquences pour le fœtus, puisque, étant tératogène, le virus peut provoquer de graves malformations, surtout pendant le premier mois de la gestation.
Pour cette raison il est très important de connaître l'état immunitaire de la patiente pour effectuer la vaccination ou, si ça n'est pas possible, pour surveiller souvent la patiente, de manière à observer l'éventuelle séroconversion,
connaître l'état immunitaire de la patiente et observer l'éventuelle séroconversion.
Quelquefois, il ne suffit pas de déterminer seulement les anticorps IgM, parce que la présence de ces anticorps peut être due à la persistance des IgM ou à la réinfection asymptomatique due à la rubéole, sans représenter un risque pour le foetus.
C'est la raison pour laquelle il est utile de doser l'avidité des anticorps IgG, puisqu'il a été démontré que ce paramètre est bas pendant la phase aiguë et qu'il augmente avec le temps. La présence des anticorps à basse avidité indique donc une infection récente ou en cours. L'avidité des IgG dans le sérum peut être dosée en utilisant ce kit trousse ELISA.

3. PRINCIPE

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
L'antigène, constitué par le virus de la rubéole purifié et inactif, est lié à la phase solide (puits de la barrette 1x8). A travers l'incubation dans le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène.
L'échantillon est versé dans deux puits (ou 4 si on effectue le test en double) et on le laisse incuber. Après un lavage de la phase solide, on met le Tampon Avidité dans un puits et la solution de lavage dans l'autre. Le premier tampon entraîne la dissociation du lien entre l'antigène et les anticorps et cette dernière sera proportionnelle à l'avidité des anticorps. Après des lavages permettant d'éliminer les protéines qui ne se sont pas liées, on effectue l'incubation avec le conjugué constitué d'anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase HRP.
Le conjugué qui ne s'est pas lié est éliminé et l'on ajoute le substrat spécifique pour l'enzyme. La couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum examiné qui sont encore liés à l'antigène sur la phase solide. Le rapport entre la densité optique du puits ou l'on a incubé le tampon de lavage est exprimé en pourcentage et il constitue la mesure de l'avidité du sérum examiné via-à-vis de l'antigène de la rubéole.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 24 réactions.
- **Porter les réactifs à température ambiante avant l'utilisation**.

MT PLATE MICROPLAQUE 3 x 16 puits sensibilisés avec le virus de la rubéole
Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (R, 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.

CONJ CONJUGUE 1 x 12 mL
Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox..
Préparation : Prêt à l'emploi.

CONTROL CONTROLE D'AVIDITE 1 x 2.5 mL
Composition : Sérum humain contenant des IgG anti-Rubéole, dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec BSA 1 % et azide de sodium 0.09 %. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.
AVIDITY BUF TAMPON D'AVIDITÉ 1 x 10 mL

Composition : Urée en solution saline tamponnée contenant du phénol (0.05 %) et du Bronidox (0.02 %), prête à l'usage sans autre dilution.
En présence de cristaux, chauffer la solution à 37 °C pour les solubiliser.

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 (H_2O_2 à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H_2SO_4 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : H_2SO_4 (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 à 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à ≥ 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Compte-minutes
- Solution 5 % de sodium hypochlorite
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

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

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

REACTIF	**CONDITIONS**
MICROPLAQUE	5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.
CONTROLE	5 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	5 semaines à 2/8 °C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8 °C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C.
TAMPON D'AVIDITE	jusqu'à péremption à 2/8 °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 être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux.
Elimination des résidus: les échantillos de serum et les reactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

Precautions et avertissements pour la securite personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des protections pour les yeux quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
   a) Le tampon de lavage contient des détergents
   b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol
   c) Le substrat est acide.
   d) Le sérum de contrôle contient 0.09 % d'azide de sodium en guise de conservateur. Les azides peuvent réagir avec les métaux des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.

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

Avertissements analytiques

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au dessous de 35 °C ni au dessus de 39 °C. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé 30 minutes à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter la contamination microbienne des réactifs parce que la validité peut se réduire et que les résultats peuvent être erronés.
3. Ne pas changer le procédé, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est interchangeable parmi différents lots. Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou dans le bain-marie. Autrement, on peut faire incuber les plaques dans une analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO_2.
10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
    - à l'installation et aux avertissements spécifiques
    - aux principes opérationnels, aux instructions, précautions, risques
    - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
    - à la maintenance et à l'assistance technique

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon peut être constitué par sérum prélevé normalement en observant toutes les précautions prévues dans le laboratoire.

Les sérums frais peuvent être utilisés encore au bout de 4 jours à +2…+8 °. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de troi 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.
Les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Si la contamination est perceptible à l'œil nu, l'échantillon doit être éliminé. En outre, il n'est pas possible d'utiliser les échantillons fortement lipémiques, ictériques, hémolysés ou contaminés.
L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

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

Exécution
Laisser un puits vide pour effectuer le blanc (seulement le substrat). Diluer les échantillons 1 :301 en versant 5 µl de sérum dans 1.5 ml de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans au moins deux puits, et 100 µl du contrôle en double. Couvrir les puits avec la feuille de protection.
Incuber pendant 60 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µL), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter dans un puits des échantillons, du contrôle, 100 µl de solution de lavage, et dans l'autre puits 100 µl du tampon d'avidité ; incuber à 37 °C pendant 10'. Aspirer le tampon et effectuer 4 lavages pendant 30 secondes. Ajouter 100 µl du conjugué dans chaque puits et faire incuber 45' à 37 °C, en couvrant les puits avec la feuille de protection. Laver la plaque encore 4 fois comme il est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits, y compris le puits du blanc). 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/contrôle en double dans les puits de la barrette
	Incuber pendant 60 minutes à 37 °C.
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)
2e ETAPE	Pour chaque échantillon/contrôle, verser 100 µl de solution de lavage dans un puits et 100 µl de tampon d'avidité dans l'autre. Incuber pendant 10 minutes à 37 °C.
	Laver pendant 30 seconde à 4 reprises (300 µL)
3e ETAPE	Mettre 100 µl de conjugué dans chaque puits
	Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.
	laver 4 fois (300 µL).
4e ETAPE	Mettre 100 µl de substrat dans les puits. Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.
5e 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

La O.D. du blanc doit être ≤ 0.150.
Le contrôle dans les puits incubés avec la solution de Lavage doit avoir une valeur de O.D. > 0.500.
Le pourcentage d'avidité du contrôle calculé comme il est indiqué dans le paragraphe "Interprétation des Resultats", doit être supérieur à 45 %.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Le pourcentage d'avidité des échantillons est exprimé et calculé en faisant le rapport entre les O.D. trouvées dans les puits contenant le tampon d'avidité et ceux qui contiennent la solution de lavage, après avoir soustrait la valeur du blanc.

$$\frac{\text{O.D avec le tampon d'avidité – O.D. blanc}}{\text{O.D. avec la solution de lavage – O.D. blanc}} \times 100 = \%\ \text{d'avidité}$$

Quand ce rapport est supérieur à 45 %, il y a présence d'IgG anti-rubéole à haute avidité ; si le rapport est inférieur au 35 %, il y a présence d'IgG anti-rubéole à basse avidité. Si le pourcentage est compris entre 35 et 45 %, nous avons la présence d'IgG anti-rubéole de moyenne avidité (Borderline). Dans ce cas, l'interprétation du test est incertaine.
On ne peut effectuer le calcul que sur les échantillons présentant une O.D. du puits lavé avec la solution de lavage ≥ 0.400.

Attention :
Si la O.D. du puits de référence est supérieure à 2.000 il faut refaire le test en diluant 1/1000.
Si la O.D. du puits de référence est < 0.400, refaire le test en diluant l'échantillon 1/101.

Répéter le test si le résultat est une avidité moyenne.
Dans tous les cas, il est conseillé de répéter le test au bout de 2 à 3 semaines afin d'évaluer toute éventuelle variation de l'avidité.

12. LIMITATIONS DE LA METHODE

La présence des IgG à haute avidité, même si elle n'exclut pas la possibilité d'une infection récente, indique fortement qu'une Rubéole est survenue au moins 4 mois auparavant. Inversement, la présence des IgG à basse avidité indique fortement qu'une Rubéole est survenue au cours des 3 mois précédents.
Le résultat du test doit toujours être évalués en conjonction avec les données de l'histoire du patient et / ou d'autres examens diagnostiques.

13. SPECIFICITE ET SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

115 échantillons ont été analysé avec le kit Diesse en parallèle avec un autre test disponible dans le commerce; la présence des IgG et des IgM spécifiques était connue.
Les échantillons ont été divisés de la manière suivante :

1. 54 provenant de sujets ayant une infection de rubéole récente (44 positifs en IgM, 4 incertains et 6 négatifs).
2. 41 échantillons provenant de femmes enceintes
3. 20 échantillons de femmes fertiles, positifs aux IgG et négatifs aux IgM.

Le kit Diesse a identifié correctement 104 cas, avec une corrélation de 90 % en comparaison avec l'autre méthode.

14. PRECISION

Tableau 1 Précision dans la série (n=6)

Echantillon	% moyenne avidité	D.S.	CV %
Basse Avidité	14	1	8
Basse Avidité	91	4	4

Tableau 2 Précision entre séries

Echantillon	% moyenne avidité	D.S.	CV %
S1	71	5	7
S2	34	3	9
S3	6	2	33

15. 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 la pipette fonctionne correctement.
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que la pipette 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.

16. BIBLIOGRAPHIE

1. S. Rousseau, K. Hedman. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. Lancet 1: 1108 (1988).
2. H. Thomas, C. Morgan. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary Rubella and rubella infection. Epidemiol. Infect. 101: 591 (1988).
3. L. Matter, K. Kogelschats, D. Germann. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J. Inf. Dis. (1997).

	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 Fabbricante	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 «ν» 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

CE
0123

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