



ENZYWELL

RUBELLA IgG

REF 91030 (96 tests)

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



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

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



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
RUBELLA IgG**
REF 91030

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA 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.

Esistono numerosi metodi per effettuare il dosaggio delle immunoglobuline specifiche.

L'Elisa è una di queste ed ha il vantaggio della completa automazione.

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 (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con virus della Rosolia (colorate in rosso)

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

CONJ CONIUGATO 1 x 16 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.

CAL CALIBRATORI 5 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-Rosolia IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione. Le UI/mL sono calcolate in riferimento alla **1st International Standard Preparation**. Il Calibratore 2 (10 UI/mL) corrisponde al Cut-off e può essere usato per l'analisi qualitativa. I valori dei calibratori sono 5, 10, 50, 100, 200 UI/mL.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF933910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

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

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

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

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

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm e 405 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	6 settimane 2/8°C busta di polietilene
SIERI DI CONTROLLO	6 settimane 2/8°C
CONIUGATO	6 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C, al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

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

Attenzione:

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

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

Avvertenze analitiche

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

Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'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 da sangue prelevato 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 (56°C per 30') può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

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

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale

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

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).

In uno strip porre i calibratori NON DILUITI possibilmente in duplicato (100 µL per pozzetto). Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

Tecnica manuale

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Mettere 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip.
-
incubare 45 min. a 37°C
-
lavare 4 volte (300 µl)
- |
| STEP 2 | Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto
-
incubare 45 min. a 37°C
-
lavare 4 volte (300 µl)
- |
| STEP 3 | Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
-
incubare 15 min. a t.a.
- |
| STEP 4 | Aggiungere 100 µL di Stop Solution
-
leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min. |

10. VALIDAZIONE DEL TEST

1. **CONTROL - (Calibratore 0):** la densità ottica (O.D.) del controllo negativo deve essere $\leq 0,6$ volte la D.O. del Calibratore 2.
2. La D.O. del Calibratore 2 maggiore o uguale 0,2 a 450 nm ; ≥ 0.16 a 450/620 nm.
3. La D.O. del Calibratore 5 deve essere ≥ 1.5 .

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati quantitativi

Sottrarre il bianco (≤ 0.150) da ciascuna densità ottica ottenuta. Riportare in grafico il valore di assorbanza dei 6 calibratori (asse y) in funzione delle concentrazioni (asse x) IU/ml, ottenute in riferimento al "Primo Standard Internazionale"). Costruire la curva standard ed ottenere la concentrazione del campione in esame per interpolazione.

NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.

Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Il grado di immunità del siero in esame può essere interpretato come segue:

IMMUNE: quando la concentrazione di IgG nel campione è >13 UI/mL

NON IMMUNE: se la concentrazione è <7 UI/mL

DUBBIO: se la concentrazione è nel range 7-13 UI/mL. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

Risultati qualitativi

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (Calibratore 2). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.3 .

Dubbio: $\geq 0.7 - \leq 1.3$.

Negativo: quando il rapporto è < 0.7 .

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Il livello delle IgM anti-Rubella dovrebbe essere determinato usando il kit Enzywell Rubella IgM (cod. 91031). Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG. Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre procedure diagnostiche.

Sebbene i sieri di controllo contenuti nel kit siano calibrati secondo il siero di riferimento della O.M.S., certe discordanze possono osservarsi quando lo stesso siero viene testato con tecniche analitiche diverse.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 17 campioni non contenenti anticorpi IgG anti-Rubella ma contenenti anticorpi IgG contro virus quali quello del Cytomegalovirus, Epstein Barr, Herpes Simplex, Parotite. In nessun caso la presenza di tali anticorpi influenzava il test.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 260 campioni, di cui 32 risultavano negativi, 220 positivi e 8 dubbi. Il metodo di confronto era la tecnica IHA.

Un titolo di 1/8 in IHA era considerato corrispondente al Cut-off in quanto nel laboratorio della sperimentazione non si giudicava indice di protezione sicura.

Nella sperimentazione si sono trovati 8 campioni 1/8. Il kit Enzywell aveva un campione falso positivo. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 1

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	227	1
	-	0	32

Il kit Enzywell ha una sensibilità del 100% ed una specificità diagnostica del 97,0%.

15. PRECISIONE

Tabella 2 Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

Cut Off	N = 21	Lotto 119	Lotto 120	Lotto 121
O.D.		0.321	0.383	0.417
CV%		4.36	6.78	5.1

Tabella 3 Precisione tra sedute

Campione	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

Il CV% ottenuto sul titolo dei campioni 2 e 3 risultava essere rispettivamente 18.1 e 11.7%.

Tabella 4 Precisione tra lotti

Tabella 4 Precisione tra lotto				
	IU/ml			
	Numero di lotto			CV%
Campione	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi 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	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL RUBELLA IgG

REF 91030

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION 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. Several methods are employed for the assay of specific immunoglobulins. Of these methods, the ELISA technique offers the advantage of being completely automated.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-3).

The purified and inactivated Rubella virus antigen is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added.

The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with Rubella Virus (coloured in red).

Use: cut the package at the opposite end from the code (R followed by the lot number) which is useful for its identification, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONJ CONJUGATE 1x16 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.

CAL CALIBRATORS 5 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum at known concentration of anti-Rubella IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide, liquid, ready for use without further dilution. The International Units are calculated according to the **1st International Standard Preparation**. Calibrator 2 (10 IU/mL) corresponds to the cut-off value and can be used in the qualitative test. The calibrators have the following values: 5, 10, 50, 100, 200 IU/mL.

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

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

Contents: Human serum not 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 (Calibrator 0).

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm and 405 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	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control sera	6 weeks at 2/8°C
Conjugate	6 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

Caution:

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

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

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.

2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. 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 mixed before the assay. Heat inactivation (56°C for 30') can give rise to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which can lead to erroneous results. Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

The test cannot be performed on human plasma.

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent.

Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED calibrators preferably in duplicate in a strip (100 µL in each well). Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well. After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min. Take the reading again at 405 nm if there are OD values higher than 2,000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample//controls to the wells of the strips.

-
Incubate for 45 min. at 37°C

-
Wash 4 times (300 µL)

STEP 2 Add 100 µL of conjugate to each well

-
Incubate for 45 min. at 37°C

-
Wash 4 times (300 µL)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

-
Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

-
Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

1. **CONTROL** - (Calibrator 0): the optical density (O.D.) of the negative control must be $\leq 0,6$ times the O.D. of Calibrator 2.
2. The O.D. of Calibrator 2 must be $\geq 0,2$ at 450 nm; ≥ 0.16 at 450/620 nm.
3. The O.D. of Calibrator 5 must be ≥ 1.5 .

11. INTERPRETATION OF RESULTS

Quantitative Results

Subtract the blank (≤ 0.150) from each O.D. obtained. Report on a graph the absorbance of the 6 calibrators (y axis) and the concentrations (x axis) in IU/mL, obtained in reference to the First International Standard. Construct a standard curve and calculate the concentration of the test sample by interpolation.

NOTE: A standard curve must be performed for each run.

If the O.D. of a serum or calibrator is higher than 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the result by 3.

The degree of immunity is interpreted as follows:

IMMUNE: when the IgG concentration in the sample is > 13 IU/mL

NON IMMUNE: if the concentration is <7 IU/mL

DOUBTFUL: if the concentration ranges between 7 and 13.

Qualitative Results

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (Calibrator 2). The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.3.

Doubtful: if the ratio is ≥ 0.7 but ≤ 1.3 .

Negative: if the ratio is < 0.7.

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

The Rubella IgM level should be determined using Enzywell Rubella IgM kit (code 91031). Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level. The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

Although the control sera used in the kit are calibrated to WHO reference serum, certain discordances of results may be observed when the same serum is tested by different analytical techniques.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

17 samples not containing anti-Rubella IgG but containing IgG antibodies against viruses such as Cytomegalovirus, Epstein Barr, Herpes Simplex, Mumps. In no case was the result of the test influenced by these antibodies.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

260 samples were analysed, 220 of which were positive, 32 negative and 8 doubtful. The comparative method was the IHA technique.

A titre of 1/8 was considered to correspond to the cut-off value, in as far this titer was not considered a sure index of protection in the laboratory performing the trial.

In the evaluation, 8 samples were tested with a titer of 1/8; Diesse had 1 false positive sample. The results are summarized in the following **Table 1**.

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	227	1
	-	0	32

The Enzywell kit had a diagnostic sensitivity of 100% and a diagnostic specificity of 97.0%.

15. PRECISION

Table 2 Within-run Precision performed on 3 different batches

Cut Off N = 21	Lot 119	Lot 120	Lot 121
O.D.	0.321	0.383	0.417
CV%	4.36	6.78	5.1

Table 3 Between-run Precision

Sample	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

The CV% obtained on the samples 2 and 3 was respectively 18.2 and 11.7%.

Table 4 Precision between batches

	IU/ml	
	Batch number	CV%

Sample	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

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

17. REFERENCES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZYWELL RUBELLA IgG

REF 91030

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

ELISA ASSAY ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON IGG-ANTIKÖRPERN GEGEN RUBELLA IN HUMANEM SERUM.

2. PHYSIOLOGIE

Das Rubella Virus ist die Ursache für eine häufige Infektionskrankheit beim Menschen, begleitet von einem typischen, diffusen Hautausschlag. Der Verlauf der Krankheit ist im Allgemeinen kurz und ohne Komplikationen. Trotzdem ist sie bei einer Infektion während der Schwangerschaft gefährlich für den Fetus, da der Virus teratogen ist und zu schweren Missbildungen insbesondere im ersten Schwangerschaftsmonat führt. Es ist daher essentiell, den Immunstatus der Patientin möglichst vor Eintritt einer Schwangerschaft zu bestimmen, um eine Impfung vorzunehmen oder, falls dies nicht möglich ist, den Verlauf der Schwangerschaft zu überwachen und zu beobachten, ob eine Serokonversion auftritt. Es gibt verschiedene Methoden für Assays zum Nachweis von spezifischen Immunglobulinen. ELISA ist eine davon und hat den Vorteil der Automatisierbarkeit.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (1-3).

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

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

Das ungebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidase Substrat zugegeben.

Die blaue Farbe, die sich entwickelt, ist proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern, die in der Probe vorhanden sind. Wenn die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäurelösung gestoppt wird, kann die entstandene gelbe Farbe einfach mit einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

4. KITKOMPONENTEN

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.

Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 12x8 Wells, beschichtet mit Rubellavirus-Antigen (rot eingefärbt).

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

CONJ KONJUGAT 1x16 mL

Inhalt: Anti-Human-IgG Antikörper (monoklonal), gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0,05 % Phenol und 0,02 % Bronidox. Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

CAL KALIBRATOREN 5 x 1.6 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum in 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung. Die IU/ml sind entsprechend der **1. Internationalen Standard Präparation** berechnet. Calibrator 2 (10 IU/ml) entspricht dem Cut-off und kann für die qualitative Bestimmung eingesetzt werden. Die Kalibratoren enthalten folgende Konzentrationen von Anti-Rubella-IgG-Antikörpern: 5, 10, 50, 100 und 200 IU/ml.

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

CONTROL IgG - IgG NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1.6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
AUSTAUSCHBAR Inhalt: Humanserum, das keine Anti-Rubella-IgG-Antikörper enthält; verdünnt in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, mit 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung (Calibrator 0).

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Gebrauchsfertig **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
 Inhalt: 0,26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0,01% Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0,05 mol/l Zitratpuffer (pH 3,8).

SAMP DIL 2 VERDÜNNUNGSMITTEL 2 (PF93611) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben. **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
 Inhalt: Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 0,09 % Natriumazid und Methylorange.

WASH BUF 10x WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
 Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0,5 % Brij.
 Vorbereitung: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

H₂SO₄ 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
 Inhalt: H₂SO₄ 0.3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

ABDECKFILM (2).

POLYETHYLENBEUTEL (1).

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplatten Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis $\geq 2,000$
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispenservolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten mit einer Präzision $\pm 2 \%$
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorid-Lösung (5%)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

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

Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

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

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

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSHINWEISE

NUR ZUR IN-VITRO DIAGNOSTIK.

Achtung: Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, das mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ war. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Agentien enthalten, sollten alle

Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

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

Gesundheits- und Sicherheitsinformationen

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

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

14. Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat bei der 1. Inkubation nicht unterhalb 35 ° und nicht über 39 °C anzeigt.**
15. Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Halbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
16. Die Testdurchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
17. Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
18. Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorid-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
19. Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
20. Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
21. Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells. .
22. Enzymimmunoassays können gelegentlich einen “Edge-Effect” zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig,) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO₂ Inkubatoren.
23. Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.

24. Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.
25. Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigt werden
26. Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
 - Installation und besondere Bedarfsartikel
 - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
 - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
 - Service und Wartung.

7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Eine Hitzeinaktivierung (30 Min. bei 56 °C) führt zu falschen Ergebnissen. Die Qualität einer Probe kann aber durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden und führt zu falschen Ergebnissen.

Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden.

Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!

8. TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells (Doppelbestimmungen werden empfohlen). Pipettieren Sie je 100 µl der unverdünnten Kalibratoren in die entsprechenden Wells (möglichst in Doppelbestimmung). Lassen Sie eine Well für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat pipettieren).

Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal mit 0,3 ml verdünntem Waschpuffer waschen (mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Konjugat in alle Wells pipettieren (außer Substratleerwert). Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal mit 0,3 ml verdünntem Waschpuffer waschen (mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert). 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert). Die Extinktion bei 450 nm oder 450/620 innerhalb von 30 Minuten messen. Wiederholen Sie die Messung bei 405 nm, falls einige ODs über 2,000 liegen.

9. TESTSCHEMA

1. 100 µl der verdünnten Probe/ Blank Reagenz/ Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettieren.
2. 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
3. 4-mal waschen (300 µl).
4. 100 µL Konjugat in alle Wells pipettieren.
5. 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
6. 4-mal waschen (300 µl).
7. 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren.
8. 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
9. 100 µL Stopplösung hinzufügen.
10. Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Min.
11. Bei Readern mit 2 Wellenlängen stellen Sie den Referenzfilter auf 600-650 nm ein.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE VALIDITÄT DES TESTS

1. **Negativkontrolle (Calibrator 0): Die optische Dichte (OD) der Negativkontrolle muss $\leq 0,6$ fache der OD des Calibrator 2 sein.**
2. Die OD des Calibrator 2 muss $\geq 0,2$ sein bei 450 nm; $\geq 0,16$ bei 450/620 nm.
3. Die OD des Calibrator 5 muss $\geq 1,5$ sein.

11. QUANTITATIVE AUSWERTUNG

Tragen Sie die ODs der Kalibratoren nach Abzug der Blank ODs auf Millimeterpapier auf. Die dazugehörigen Titer der Probe können durch Interpolation abgelesen werden.

HINWEIS: Für jeden Testansatz muss eine Eichkurve erstellt werden. Falls die ODs irgendeiner Probe oder eines Kalibrators über 2,0 liegen, messen Sie diese nochmals bei 405 nm und multiplizieren Sie den Wert mit 3.

Umrechnung der ODs in Units/ml

Die Anti-Rubella IgG-Konzentrationen werden in IU/ml angegeben und wurden aus der 1.ISP berechnet.

Der Grad der Immunität kann folgendermaßen interpretiert werden:

- IMMUN: wenn die Anti-Rubella IgG-Konzentration > 13 IU/ml.
- NICHTIMMUN: wenn die Anti-Rubella IgG-Konzentration < 7 IU/ml ist.
- ZWEIFELHAFT: Ein Ergebnis zwischen diesen beiden Werten. In diesem Falle sollte die Probenbestimmung nach 2 Wochen wiederholt werden.

QUALITATIVE ERGEBNISSE

Berechnen Sie das Verhältnis zwischen Extinktionsmittelwert der Probe und dem des Cut-Off (Calibrator 2). Die Probe ist :

Positiv: $> 1,3$

Zweifelhaft: $\geq 0,7$ aber $\leq 1,3$

Negativ: $< 0,7$

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

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

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

Zur Erstellung der Diagnose sollte die Bestimmung von Rubellavirus immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.

Obwohl die Kalibratoren in diesem Assay gegen ein WHO-Referenzserum standardisiert wurden, können andere Analysenmethoden zu anderen Ergebnissen führen.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

17 Proben, die kein Rubella IgG aber IgG-Antikörper gegen Cytomegalovirus, Epstein Barr, Herpes Simples und Mumps enthielten, wurden getestet. In keinem Fall wurde das Testergebnis durch diese Antikörper beeinflusst.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer Studie wurden 260 Proben getestet, von denen 220 positiv, 32 negativ und 8 zweifelhaft waren.

Ein Titer von 1:8 wurde als dem Cut-off entsprechend betrachtet, wobei das durchführende Labor diesen Titer nicht als sicheren Index für einen ausreichenden Schutz betrachtete. In der Evaluierung wurden 8 Proben mit einem Titer von 1.8 gefunden, wobei mit dem Adaltis-Test ein falsch positives Ergebnis gefunden wurde.

Table 1

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	227	1
	-	0	32

Dieser Assay bietet somit eine diagnostische Sensitivität von 100 % und eine diagnostische Spezifität von 97 %.

15. PRÄZISION

Table 2 Die Intraassay-Präzision wurde mit drei verschiedenen Lots ermittelt

Cut Off	N = 21	Lot 119	Lot 120	Lot 121
O.D.		0.321	0.383	0.417
CV%		4.36	6.78	5.1

Table 3 “Interassay” - Präzision

Probe	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

Table 4 “Lot-zu-Lot” Präzision

Table 4: Lot 2a Lot 1 Precision				
	IU/ml			
	Lotnummer			CV%
Probe	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

16. “TROUBLESHOOTING” (PROBLEMLÖSUNGEN)

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

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHE	MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG
Ungültiger Testrun (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testrun (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.
	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschrift. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäßige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

17. LITERATUR

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

**ENZYWELL
IgG ΕΡΥΘΡΑΣ**
REF 91030

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ 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.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι προσδιορισμού των ειδικών ανοσοσφαιρινών.

Η μέθοδος Elisa είναι μία από αυτές και έχει επιπλέον το πλεονέκτημα ενός πλήρους αυτοματισμού.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Το αντιγόνο του Ιού της Ερυθράς, κεκαθαρμένο και αδραντοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση (ταινίες κυψελίδων 1x8). Οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό. Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgG σεσημασμένα με υπεροξειδάση.

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

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

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.
- **Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12x8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με ιό της Ερυθράς (χρώματος ερυθρού).

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών 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 τις απαραίτητες ταινίες. 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 16 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.

CAL ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ 5 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός, με γνωστό τίτλο των αντισωμάτων IgG κατά της Ερυθράς σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον διάλυση. Οι Διεθνείς μονάδες IU/mL είναι υπολογισμένες σύμφωνα με το **1st International Standard Preparation**. Ο Βαθμονομητής 2 (10 IU/mL) αντιστοιχεί με τον Cut-off και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτικά ανάλυση. Οι τιμές των βαθμονομητών είναι 5, 10, 50, 100, 200 IU/mL.

Χρώμα: Το χρώμα είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των αντισωμάτων.

CONTROL IgG - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgG (PF933910) 1 x 1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός χωρίς αντισώματα IgG κατά της Ερυθράς, αραιωμένος σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση (Βαθμονομητής 0).

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

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

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

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

Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

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

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x12 mL Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

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

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

Διάλυμα H₂SO₄ 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).

ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.

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

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

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

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

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ

ΣΥΝΘΗΚΕΣ

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ

6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο

ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ στους 2/8°C

ΣΥΖΥΓΕΣ

6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ στους 2/8°C

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ**ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C****Προσοχή:**

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

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

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

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

Οδηγίες για την ανάλυση

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

22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO₂.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
 - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη

7. ΕΙΛΟΣ 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 H₂O)

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 µL ορού σε 1 mL διαλύτη και ρίξτε 100 µL κάθε αραιωμένου δείγματος σε κάθε κυψελίδα (σας συμβουλευουμε να κάνετε την ανάλυση εις διπλούν).

Σε μία ταινία ρίξτε τους βαθμονομητές ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΡΑΙΩΣΕΤΕ αν είναι δυνατόν εις διπλούν (100 µL ανά κυψελίδα). Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού δείγματος, χρησιμοποιώντας μόνο 100 µL υποστρώματος.

Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διάρκειας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 µl) προσθέστε 100 µL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C καλύπτοντάς τις και πάλι με την προστατευτική ταινία.. Ξεπλύνετε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 µL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 µL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.. Αν η τιμή των Ο.Π. υπερβαίνει τις 2.000, διαβάστε και πάλι στα 405.

9. Διάγραμμα της ανάλυσης

Χειροκίνητη τεχνική

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Ρίξτε 100 µL αραιωμένου ορού/ορών ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας
-
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
-
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
- |
| STEP 2 | Ρίξτε 100 µL συζυγούς ανά κυψελίδα
-
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
-
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
- |

- STEP 3 Ρίξτε 100 μ L Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
-
Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
-
STEP 4 Προσθέστε 100 μ L Stop Solution
-
Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

- 1. CONTROL - (Βαθμονομητής 0):** η οπτική πυκνότητα (Ο.Π.) του αρνητικού ορού ελέγχου, πρέπει να είναι $\leq 0,6$ φορές η Ο.Π. του Βαθμονομητή 2.
- Η Ο.Π. του Βαθμονομητή 2 πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με 0,2 στα 450 nm ≥ 0.16 στα 450/620 nm.
- Η Ο.Π. του Βαθμονομητή 5 πρέπει να είναι ≥ 1.5 .

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Ποσοτικά αποτελέσματα

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (≤ 0.150) από κάθε τιμή οπτικής πυκνότητας. Μεταφέρατε σε γράφημα τις τιμές απορρόφησης των 6 βαθμονομητών (άξονας y) και τις συγκεντρώσεις (άξονας x) σε IU/mL, που έχουν υπολογιστεί με σημείο αναφοράς το “Πρώτο Διεθνές Πρότυπο”. Κατασκευάστε την στάνταρντ καμπύλη και θα έχετε έτσι τη συγκέντρωση του δείγματος με παρεμβολή.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Πρέπει να κάνετε μία στάνταρντ καμπύλη για κάθε κύκλο ανάλυσης.

Αν η Ο.Π. ενός δείγματος ή ενός βαθμονομητή, είναι μεγαλύτερη από 2,0, διαβάστε την στα 405 nm και πολλαπλασιάστε την τιμή επί 3.

Ανάλογα με τον βαθμό ανοσίας του ο υπό εξέταση ορού, μπορεί να ερμηνευτεί ως εξής:

ΑΝΟΣΙΟΣ: όταν η συγκέντρωση των IgG στο δείγμα είναι >13 IU/mL

ΜΗ ΑΝΟΣΙΟΣ: όταν η συγκέντρωση είναι <7 IU/mL

ΑΜΦΙΒΟΛΙΟΣ: όταν η συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 7-13 IU/mL. Σε μία τέτοια περίπτωση συνιστάται η επανάληψη του προσδιορισμού εις διπλούν.

Ποιοτικά αποτελέσματα

Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της Ο.Π. του δείγματος και εκείνης του Cut-Off (Βαθμονομητής 2). Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: αν ο λόγος είναι > 1.3 .

Αμφίβολο: $\geq 0.7 - \leq 1.3$.

Αρνητικό: αν ο λόγος είναι < 0.7 .

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

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Οροί που έχουν συλλεχθεί κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν υπάρχουν μόνο αντισώματα IgM, μπορεί να προκύψουν αρνητικοί με αυτή την τεχνική.

Η τιμή των IgM κατά της Ερυθράς πρέπει να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το kit Enzywell Rubella IgM (κωδ. 91031). Εναλλακτικά θα αναλυθεί ένα δεύτερο δείγμα που θα έχει συλλεχθεί 8-14 ημέρες μετά, για να εξακριβωθεί τυχόν αύξηση των IgG. Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα του τεστ θα πρέπει να συνεκτιμηθεί με άλλα δεδομένα προερχόμενα από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

Αν και οι οροί ελέγχου, που περιέχονται στο kit, έχουν βαθμονομηθεί σύμφωνα με τον ορό αναφοράς του Π.Ο.Υ, μπορεί ωστόσο να παρατηρηθούν ασυμφωνίες σε περίπτωση που ο ίδιος ορός χρησιμοποιείται σε διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 17 δείγματα που δεν περιείχαν αντισώματα IgG κατά της Ερυθράς, αλλά αντισώματα IgG κατά ιών όπως ο Κυτταρομεγαλοϊός, ο Epstein Barr, ο Απλός Έρπητας και η Παρωτίτιδα. Η παρουσία αυτών των αντισωμάτων δεν επηρέασε το τεστ σε καμία περίπτωση.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν κλινικό πειραματισμό, που έγινε σε ένα νοσοκομειακό εργαστήριο, αναλύθηκαν 260 δείγματα, εκ των οποίων 32 προέκυψαν αρνητικά, 220 θετικά και 8 αμφίβολα. Η μέθοδος με τη οποία έγινε η σύγκριση, ήταν η ΙΗΑ.

Ένας τίτλος 1/8 στην ΙΗΑ θεωρείτο ό,τι αντιστοιχούσε με τον Cut-off επειδή στο εργαστήριο του πειραματισμού δεν θεωρείτο δείκτης ασφαλούς προστασίας.

Κατά τον πειραματισμό βρέθηκαν 8 δείγματα 1/8. Το kit Enzywell υπέδειξε ένα δείγμα ως ψευδώς θετικό. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	-
		227	1
DIESSE	+		
	-	0	32

Το kit Enzywell παρουσιάζει ευαισθησία 100% και διαγνωστική ειδικότητα 97,0%.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ**Πίνακας 2 Ακρίβεια κατά μία ανάλυση που έγινε με 3 διαφορετικές παρτίδες**

Cut Off	N = 21	Παρτίδα 119	Παρτίδα 120	Παρτίδα 121
Ο.Π.		0.321	0.383	0.417
CV%		4.36	6.78	5.1

Πίνακας 3 Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

Δείγμα	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

Η CV% που προέκυψε από τον τίτλο των δειγμάτων 2 και 3 ήταν αντίστοιχα 18.1 και 11.7%.

Πίνακας 4 Ακρίβεια μεταξύ παρτίδων

	IU/ml			
	Αριθμός παρτίδας			CV%
Δείγμα	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ	ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε τον κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβετε το τεστ.
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφηση	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με	Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την

	πολύ αργό ρυθμό	έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια
	Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα	Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά την αναρρόφηση.
	Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής	Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε με ένα χαρτομάντιλο το πλακίδιο
Ανεπαρκής θερμοκρασία	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης
	Η ποσότητα του υποστρώματος που έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL RUBELLA IgG

REF 91030

(Español)

1. INDICACIONES

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

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El virus della 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 en cuanto 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.

Hay varios métodos para efectuar la titulación de las inmunoglobulinas específicas.

Elisa es una de estas y tiene la ventaja de la completa automatización.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

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

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de virus de Rubéola (pintados en rojo)

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

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-Rubéola IgG, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y azida sódica al 0,09%, líquido, líquido listo para su uso sin diluciones adicionales. Las UI/mL son calculadas en referencia al **1st International Standard Preparation**. El Calibrador 2 (10 UI/mL) corresponde al Cut-off y puede ser utilizado para el análisis cualitativa. Los valores de los calibradores son 5, 10, 50, 100, 200 UI/mL.

Pintura: el color de los calibradores es proporcional a la relativa titulación del anticuerpo

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

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

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

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

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

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

Para la dilución de las muestras de suero.

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

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

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

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

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000) (por lo menos)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) dispensante volúmenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

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

6. PRECAUCIONES DE USO

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

Cuidado:

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

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El tampón de lavado contiene detergentes
 - b) El conjugado contiene fenol
 - c) El sustrato es ácido
 - d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas. Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

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

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede proveer resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

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

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Rinsing Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los calibradores SIN DILUIR en una tira, preferiblemente por duplicado (100 µL para cada pocillo). Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µl). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.

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

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

Leer otra vez a 405 nm si están OD superiores a 2.000.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

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

-

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µl)

-

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µl)

-

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

-

Incubar 15 min. a T.A.

-

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-

Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

1. Calibrador 0 (Control Negativo): la densidad óptica (DO.) del control negativo debe ser ≤ 0,6 veces la D.O. del Calibrador 2.
2. La D.O. del Calibrador 2 debe ser ≥ 0.2 a 450 nm; ≥ 0.16 a 450/620 nm
3. La D.O. del Calibrador 5 debe ser ≥ 1.5.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Resultados Cuantitativos

Restar el valor del blanco (> 0.150) a cada densidad óptica obtenida. Poner en el gráfico las D.O. de los 6 calibradores (eje y) en función del título (eje x) IU/ml obtenidas con referencia "Primer Estándar Internacional". Construir la curva estándar y obtener el título correspondiente de la muestra examinada por interpolación.

NOTA: Hay que hacer una curva estándar por cada ciclo.

Si la D.O. de una muestra u calibrador es más de 2,0, leer a 405 nm y multiplicar el valor por 3.

El nivel de inmunidad del suero se puede considerar como sigue:

Inmune: si la concentración de IgG en la muestra es > 13 UI/mL

Dudoso: si la concentración está en el range 7-13 UI/mL. En este caso se aconseja efectuar una doble prueba.

No-inmune: si la concentración es < 7 UI/mL.

Resultados cualitativos

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off (Calibrador 2).

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.3

Dudoso: $>=0.7 - <=1.3$

No-inmune: si la concentración es < 0.7

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

12. LIMITACIONES

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

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

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

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 17 muestras sin anticuerpos IgG anti-Rubéola, contenentes anticuerpos IgG contra virus como lo de la Rubéola, Epstein Barr, Herpes Simplex, Parotitis. En ningún caso la presencia de estos anticuerpos afectaba el test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 260 muestras, 32 de las cuales fueron negativas, 220 positivas y 8 dudosas. El método de referencia utilizado era el método IHA. Un título de 1/8 en IHA era considerado correspondiente al Cut-off, en cuanto en el laboratorio de la experimentación no se consideraba índice de segura protección. Durante la prueba se encontraron 8 muestras 1/8. El kit Enzywell tenía una muestra falsa-positiva. Los resultados están resumidos en la tabla siguiente.

Tabla 1

		REFERENCIA	
		+	-
		227	1
DIESSE	+		
	-	0	32

El kit Enzywell ofrece una sensibilidad del 100% y especificidad de diagnóstico del 97,0%.

15. PRECISIÓN

Tabla 2 Precisión intra-ensayo hecha sobre 3 lotes distintos

Cut Off	N = 21	Lote 119	Lote 120	Lote 121
O.D.		0.321	0.383	0.417
CV%		4.36	6.78	5.1

Tabla 3 Precisión en series y lotes

Campione	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

El CV% obtenido sobre el título de las muestras 2 y 3 resultaba ser respectivamente 18.1 y 11.7%.

Tabla 4 Precisión en lotes

Tabla 4. Precisión en lotes				
	IU/ml			
	Número de lote			CV%
Muestra	132	133	134	
n. 1	12	12	13	5
n. 2	50	42	41	11

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



PRECAUTIONS D'UTILISATION

**ENZYWELL
RUBELLA IgG**
REF 91030

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE 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,

De nombreuses méthodes existent pour effectuer le dosage des immunoglobulines spécifiques. Le système ELISA offre l'avantage d'être complètement automatique. Le diagnostic sérologique de la rubéole peut être effectué en titrant les IgM spécifiques, puisque ces anticorps, associés avec les symptômes cliniques, ont une grande valeur diagnostique.

3. PRINCIPE

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

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

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Un kit permet de réaliser 96 déterminations.
- Laisser les réactifs revenir à la température ambiante avant de les utiliser.

MT PLATE MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec le virus de la Rubéole (couleur rouge)

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.

CAL CALIBRATEURS 5 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG anti-Rubéole, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution. Les UI/mL sont calculées en référence à la préparation « **1st International Standard** ». Le calibrateur 2 (10 UI/mL) correspond au contrôle seuil et il peut être utilisé dans l'analyse qualitative. Les valeurs des calibrateurs sont 5, 10, 50, 100, 200 UI/mL.

Couleur : la couleur des sérums de contrôle dépend de la concentration en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL

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

Préparation : Prêt à l'emploi.

CONTROL IgG - CONTROLE NEGATIF IgG (PF93910) 1 x 1.6 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution. (Calibrateur 0).

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

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

Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.
En présence de cristaux : chauffer la solution à **37 °C** pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

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

Pour diluer les échantillons de sérum.

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

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

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

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

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

SACHET EN POLYETHYLENE (1)

FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm et 405 nm avec linéarité jusqu'à 2 000)
- Laveur de microplaques (recommandé) capable de fournir des volumes de 225-375 µL
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipettes pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µL de solution
- Gants à usage unique
- Chronomètre
- Solution d'hypochlorure de sodium (5 %)
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. 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 du kit.

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

REACTIF	CONDITIONS
MICROPLAQUE	6 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène
CALIBRATEURS	6 semaines à 2/8 °C
CONJUGUE	6 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
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. Les réactifs contenant du matériel d'origine humaine ont été contrôlés et trouvés négatifs en ce qui concerne les anticorps anti-VIH-1/VIH-2, anti-VHC et l'antigène HBs (selon la méthode FDA). Cependant, ils doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux et, par conséquent, maniés avec précaution.

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

PRECAUTIONS DE SECURITE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des gants à usage unique et des lunettes de protection lors du maniement des échantillons et pendant l'exécution du test. Se laver soigneusement les mains après le maniement.
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) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09 %). Les azides peuvent réagir avec les métaux (cuivre et plomb) des canalisations et former ainsi des composés explosifs.

En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Tout matériel non jetable doit être stérilisé après son utilisation, de préférence en autoclave à 121 °C pendant 1 h. Tout matériel jetable doit être autoclavé ou incinéré après son utilisation.
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 acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec une quantité suffisante de solution d'hypochlorure de sodium pour que la concentration finale soit de 1 % minimum. Un contact de 30 minutes avec cette solution est nécessaire pour garantir une décontamination 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, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorure de sodium. Tout matériel (notamment les gants) souillé par d'éventuelles éclaboussures doit être considéré comme étant potentiellement infectieux et éliminé selon la réglementation en vigueur.

PRECAUTIONS ANALYTIQUES

1. Laisser les réactifs et les échantillons revenir à la température ambiante (+18-30 °C) avant leur utilisation. Aussitôt après leur utilisation, conserver les réactifs à la température de conservation recommandée. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit ni descendre au-dessous de 35 °C, ni monter au-dessus de 39 °C. Laisser le sachet contenant les barrettes revenir à la température ambiante pendant 30 minutes avant de l'ouvrir.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption . Eviter toute contamination microbienne des réactifs susceptible d'affecter les résultats.
3. Ne pas modifier le mode opérationnel indiqué, ni remplacer les réactifs par d'autres provenant de lots ou de fournisseurs différents (à moins que cela ne soit spécifié sur la notice d'utilisation). Se référer au paragraphe « CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS ». Ne pas réduire les temps d'incubation indiqués.
4. Toute 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 différentes pour chaque réactif.
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 un couvercle et incubées à 37 °C soit au bain-marie, soit dans un incubateur ou dans une analyseur adapté. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Les échantillons fortement hémolysés, les sérums incomplètement coagulés, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec les instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement le manuel d'utilisation des instruments utilisés ; en particulier les chapitres concernant :
 - L'installation et les précautions spécifiques.
 - Le principe, les instructions, les précautions et les risques d'utilisation.
 - Les spécifications du fabricant et les performances de l'instrument.
 - La maintenance

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

Utiliser des échantillons de sérum frais ou décongelé. Les échantillons peuvent être stockés à +2...+8 °C pendant 4 jours.

Pour un stockage plus long, congeler les sérums à -20°C . Peut subir jusqu'à un maximum de trois décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant d'être utilisés. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés.

Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

Ne pas utiliser d'échantillon 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).

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

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

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

Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes. Lire la D.O. de nouveau à 405 nm s'il y a des D.O. supérieures à 2,000.

9. SCHEMA D'ANALYSE

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

Incuber pendant 45 minutes à 37°C .

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

2e ETAPE Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits.

Incuber pendant 45 minutes à 37°C .

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

3e ETAPE Mettre 100 µl de substrat dans les puits.

Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.

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

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

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

1. **CONTROL** - (Calibrateur 0) : la D.O. du contrôle négatif doit être $\leq 0,6$ -fois la D.O. du calibre 2.
2. La D.O. du calibrateur 2 doit être ≥ 0 à 450 nm ; ≥ 0.16 à 450/620 nm.
3. La D.O. du calibrateur 5 doit être ≥ 1.5 .

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats quantitatifs

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (≤ 0.150). Reporter sur un graphique la valeur d'absorption de chaque calibrateur (axe y) et la concentration (axe x) en IU/mL, obtenues par rapport au 1^{er} Standard International. Construire la courbe standard et rechercher la concentration de l'échantillon par interpolation.

NOTE : Il faut réaliser une courbe standard à chaque séance.

Si la D.O. d'un sérum ou d'un échantillon est supérieure à 2.0, lire la D.O. à 405 nm et multiplier la valeur par 3.

Le niveau d'immunité peut être interprété comme il est indiqué ci-dessous :

IMMUNE : quand la concentration des IgG dans l'échantillon est > 13 UI/mL

NON IMMUNE : quand la concentration des IgG est <7 UI/mL

INCERTAIN : quand la valeur est comprise entre les valeurs 7-13. Dans ce cas, il faut refaire l'essai en double.

Résultats qualitatifs

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

L'échantillon est considéré comme étant :

Positif : si le rapport est $> 1,3$

Incertain : $\geq 0,7 - \leq 1,3$

Négatif : si le rapport est $> 0,7$

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

12. LIMITES DE LA METHODE

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode. Le niveau des IgM anti-Rubella doit être déterminé en utilisant le kit Enzywell Rubella IgM (code 91031). Autrement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard, devrait être contrôlé en parallèle pour déterminer un incrément des anticorps IgG. Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés avec d'autres observations.

Bien que les contrôles contenus dans le kit soient calibrés selon la préparation de l'OMS, quelques discordances peuvent se présenter quand le même échantillon est testé avec des techniques différentes.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

17 sérums qui ne contenaient pas d'IgG anti-Rubella mais qui contenaient des IgG contre d'autres virus comme le Cytomégalovirus, l'Epstein Barr, l'Herpes Simplex et la Parotidite, ont été testés. L'on n'a trouvé aucune interférence.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

260 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique : 32 ont été négatifs, 220 positifs et 8 incertains. La méthode IHA était utilisée en guise de technique de comparaison.

On a trouvé 8 sérums avec un résultat 1/8. Le test Enzywell avait un faux-positif. Les résultats sont reportés sur le

Tableau 1

		REFERENCE	
		+	-
		227	1
DIESSE	+		
	-	0	32

Sensibilité diagnostique 100 %

Spécificité diagnostique 97.0 %.

15. PRECISION

Tableau 2 Précision dans la série effectuée avec 3 lots différents

Cut Off	N = 21	Lot 119	Lot 120	Lot 121
O.D.		0.321	0.383	0.417
CV %		4.36	6.78	5.1

Tableau 3 Précision entre séries

Echantillon	IU/ml					CV %
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n° 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n° 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

Tableau 4 Précision entre lots

Tableau 4 : Précision entre lots				
	EU/mL			
	Numéro de Lot			CV %
Echantillon	132	133	134	
n° 1	12	12	13	5
n° 2	50	42	41	11

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
----------	------------------	-----------------

Série non valable (tous les résultats sont négatifs y compris celui du Contrôle-positif)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou erreur de maniement dans l'ajout des réactifs	Contrôler le protocole. 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 les instructions d'utilisation, paragraphe 4).
		Contrôler, sur une microplaque inutilisée, si elle a été exposée à l'humidité. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Série non valable (tous les résultats sont positifs y compris celui du Contrôle-négatif)	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle quantité de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement
	Délai trop long pour la distribution des réactifs	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.
	Présence d'impuretés sur le parcours optique	Contrôler l'absence d'impuretés sur la source lumineuse et le détecteur. Essuyer le fond de la microplaque avec un chiffon doux.
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 de substrat ajouté incorrect	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et él.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL RUBÉOLA IgG

REF 91030

(PORTUGUÊS)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

KIT IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ANTICORPOS CLASSE IgG PARA RUBÉOLA NO SORO HUMANO, COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O vírus da Rubéola provoca uma doença muito comum nos humanos, acompanhada por um rash difuso típico. O curso da doença é em geral curto e sem complicações. Contudo, é prejudicial para o feto se for contraída durante a gravidez, porque o vírus é teratogénico e pode provocar malformações muito sérias, especialmente durante o primeiro mês de gravidez. É portanto essencial determinar o estado de imunidade do paciente antes de iniciar a gravidez, se possível, para efectuar a vacinação ou, se for impossível, controlar o decurso da gravidez para verificar se a seroconversão aconteceu. Alguns métodos são usados para o ensaio de imunoglobulinas específicas.

Destes métodos, a técnica ELISA tem a vantagem de ser completamente automatizado.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática) (1-3)

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

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

O conjugado desligado é eliminado, e o substrato de peroxidase é adicionado.

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

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.
- **Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

MT PLATE MICROPLACA 12x8 poços cobertos com vírus de Rubéola (corados de violeta).

Utilização: abra a embalagem no lado oposto do código (R mais o número do lote), retire o suporte e as barras da embalagem folheada para serem usadas, e coloque as barras não usadas no saco de polietileno com gel de sílica, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-humanos IgG marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL

Conteúdo: O soro humano diluído em concentrações conhecidas de anticorpos anti-Rubéola IgG, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional. As Unidades Internacionais são calculadas com referência a 1st International Standard Preparation. O Calibrador 2 (10 UI/ml) corresponde ao valor de corte e pode ser usado no teste qualitativo. Os calibradores têm os seguintes valores: 5, 10, 50, 100, 200 UI/ml.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

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

Conteúdo: O soro humano, não contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-Rubéola IgG, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional (Calibrador 0).

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

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij 0.5% .

Preparação: diluir o volume requerido 1:10 com água destilada para obtenção do tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

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

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Prontos a usar **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0.26 mg/mL e peróxido de hidrogênio a 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
H₂SO₄ 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

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

A data de validade está impressa em cada componente e na etiqueta da embalagem

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

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

6. PRECAUÇÕES

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO APENAS.

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

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

1. Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave as mãos meticulosamente quando tiver acabado.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
 - a) O tampão para enxaguar contém detergentes
 - b) O conjugado contém fenol
 - c) O substracto é ácido
 - d) Os controlos contêm azida de sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

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

Precauções analíticas

1. Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Verifique se o termostato não desce abaixo de 35°C ou acima de 39°C.** Abra o envelope que contém as tiras após cerca de 30 minutos à temperatura ambiente, no mínimo.
2. Não utilize reagentes além da data de validade anunciada. Contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
3. Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam estipulados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
4. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
5. Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
7. Deve-se ter cuidado para não haver contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
8. Deve ser tomado cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “assopre” as microplacas.
9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um “efeito de margem” que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.
10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha está presente na superfície do líquido antes de a ler.
11. A utilização de amostras altamente hemolisadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.
12. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
13. Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:
 - instalação e requisitos particulares
 - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e reparação

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta de soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções por boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a -20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente misturadas antes de efectuar o teste. Inactivação por calor (56°C durante 30') podem dar resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas devem ser evitadas.

O teste não pode ser executado em plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica manual

Prepare a quantidade necessária de tiras

Prepare o tampão de lavagem diluindo-o tampão de enxaguamento 10x.

(100 mL + 900 mL H₂O).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente.

Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque calibradores NÃO DILUÍDOS na tira, se for possível em duplicado, (100 µL em cada poço). Deixe um poço para a nula, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato.

Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µl), junte 100 µL de conjugado a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais quatro vezes, como está descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído, 100 µL/poço.

Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem.

A adsorção (D.O.D). é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min. Faça novamente a leitura a 405 nm se houver DO maior do que 2,000.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

PASSO 1 Coloque 100 µL de amostra diluída/controlos nos poços das tiras.

-

Incube durante 45 minutos a 37°C

-

Lave quatro vezes. (300 µl)

-

PASSO 2 Junte 100 µL de conjugado a cada poço

-

Incube durante 45 minutos a 37°C

-

Lave quatro vezes. (300 µl)

-

PASSO 3 Junte 100 µL de substrato a cada poço

-

Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente

-

PASSO 4 Adicione 100 µL de solução de paragem.

-

Leia a adsorção a 450 nm dentro de 30 min.

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

1. **CONTROLO - (Calibrador 0):** a densidade óptica (D.O.) do controlo negativo deve ser $\leq 0,6$ vezes a D.O. do Calibrador 2

2. A D.O. do Calibrador 2 deve ser $\geq 0,2$ a 450 nm; $\geq 0,16$ a 450/620 nm.

3. A D.O. do Calibrador 5 deverá ser $\geq 1,5$.

11. INTERPRETAÇÃO DO TESTE

Resultados quantitativos

Subtraia o nulo a cada D.O. obtido. Registe num gráfico a absorbância dos 6 calibradores (eixo y) e concentrações (eixo x) em UI/ml, obtidas por referência ao First International Standard. Construa uma curva standard e calcule a concentração da amostra de teste por interpolação.

NOTA: Para obter resultados válidos, é necessário executar uma curva standard para cada ensaio. Se a D.O. de cada amostra ou calibrador estiver acima de 2.0, faça a leitura a 405 nm e multiplique o valor por 3.

O grau de imunidade pode ser interpretado como se segue:

IMUNE: quando a concentração de IgG na amostra for > 13 UI/mL

NÃO IMUNE: se a concentração é < 7 UI/mL.

DUVIDOSA: se a concentração estiver entre 7 and 13.

Resultados qualitativos

Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor de corte (Calibrador 2). A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.3 .

Duvidosa: $>= 0.7 - <= 1.3$

Negativa: se a relação for < 0.7 .

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

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

O nível de Rubéola IgM deve ser determinado usando o kit Enzywell Toxoplasma IgM (code 91031). Como alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias depois deve ser testada em paralelo para determinar um aumento do nível de anticorpos IgG.

O resultado de teste deve ser usado em conjunção com a informação disponível na avaliação de outros procedimentos de diagnóstico.

Apesar de os soros de controlo usados serem calibrados segundo o soro de referência da OMS, algumas discrepâncias de resultados podem ser observadas quando o mesmo soro é testado por diferentes técnicas analíticas.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 17 amostras que não continham anti-Rubéola IgG, mas que continham anticorpos IgG para vírus como os da citomegalovírus, Epstein Barr, Herpes Simplex e Papeira. Em caso algum a presença destes anticorpos influenciou o teste.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

260 amostras foram analisadas, onde 32 provaram ser negativas e 220 positivas e 8 duvidosas. O método comparativo foi a técnica IHA.

Uma titulação de 1/8 foi considerada correspondente ao valor de corte, enquanto este grau não foi considerado um mostrador seguro de protecção no laboratório que efectuou o exame.

Na avaliação, 8 amostras foram testadas com um grau 1/8, DIESSE teve 1 amostra falsa positiva. Os resultados são sumarizados na tabela 1 seguinte:

	REFERÊNCIA	
	+	-
+	227	1
DIESSE	0	32

O kit Enzywell tem uma sensibilidade diagnóstico de 100.0% e uma especificidade de 97.0%.

15. PRECISÃO

Tabela 2. Precisão intrínseca efectuada em 3 lotes diferentes

Valor directo n=21.	Lote 119	Lote 120	Lote 121
D.O.	0.321	0.383	0.417
CV%	4.36	6.78	5.1

Tabela 3. Precisão “Intra-Teste”

Campione	IU/ml					CV%
	I Run	II Run	III Run	IV Run	V Run	
n. 2	10.2	16.5	14.9	13.9	12.1	18,1
n. 3	41.2	50.8	49.1	57.5	49.2	11,7

Tabela 4 – Precisão entre lotes

Tabela 4 – Precisão entre lotes				
	UI/ml			
	Número de lote			CV%
Amostra	132	133	134	
Nº 1	12	12	13	5
Nº 2	50	42	41	11

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no anexo da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dissecante de gel de sílica deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substrato.
	Lavagem inadequada	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta dos poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções recomendadas de utilização.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. M. Gravell, P. Dorsett et al.: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Inf. Dis. 136 (Suppl.) S300 (1977).
3. A. Voller and D. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella. Brit. J. Exp. path. 56: 338 (1975).

	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 Fabbicante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

CE
0123

DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-587111