



*ENZYWELL*

**VARICELLA IgM**

**REF 91079 (48 tests)**

**REF 91089 (96 tests)**

Prodotto da/Manufactured by/ Fabricado por:  
DIESSE Diagnostica Senese  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



**INDICE / INDEX / INDICE / CONTEÚDO**

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / INDICACIONES DE USO / UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST/ SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIODEL MÉTODO / PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDIMENTO DE TESTE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / VALIDATION OF THE TEST / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISIÓN / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / REFERÊNCIAS



## ENZYWELL VARICELLA ZOSTER IgM

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

(Italiano)

### 1. UTILIZZAZIONE

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

### 2. INTRODUZIONE

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

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

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

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

### 3. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

### 4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

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

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

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

**CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

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

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

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

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

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

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

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

**Preparazione:** Pronto all'uso.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

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

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Pronto all'uso.

**Contenuto:** Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

#### **ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.**

- Incubatore a 37°
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi da 225-375 µL
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette e puntali capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

#### **5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**

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

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

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

<b>REAGENTE</b>	<b>CONDIZIONI</b>
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
ANTIGENE RICOSTITUITO	5 gg 2/8°C se ricostituito con coniugato; (-20°C se ricostituito con Wash Buffer. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti; vedi avvertenza analitica n. 1).
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

**6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE****SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C****Attenzione:**

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

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

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

Avvertenze analitiche

1. **L'antigene ricostituito con il coniugato non è stabile dopo congelamento. Nel caso fosse previsto un consumo ridotto di antigene si può procedere come segue: Ricostituire l'antigene in 1/10 del volume riportato in etichetta con Wash Buffer pronto uso (es. volume in etichetta 3 ml: ricostituire con 0,3 ml di Wash Buffer). Prelevare il quantitativo di antigene necessario all'esecuzione del test e miscelare con 10 parti di coniugato. Aliquotare e congelare il restante antigene. Al momento dell'uso, scongelare e miscelare con 10 parti di coniugato.**
2. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.** Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
3. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
4. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
5. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
6. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
7. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
8. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
9. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
10. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO<sub>2</sub>.

11. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
12. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
13. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
14. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
  - installazione e requisiti particolari
  - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
  - specifiche del produttore e performance dello strumento
  - manutenzione e assistenza tecnica

## **7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE**

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore non fornisce risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

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

**Il test non è applicabile al plasma umano.**

## **8. PROCEDIMENTO**

### Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta) oppure, in caso di minore consumo, con Wash Buffer pronto uso (1 decimo del volume in etichetta) e poi 1/11 nel coniugato.

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

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

<b>9. SCHEMA DEL SAGGIO</b>
-----------------------------

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

## **10. VALIDAZIONE DEL TEST**

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

## **11. INTERPRETAZIONE DEL TEST**

### **Risultati qualitativi**

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

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

Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è  $> 1.2$ .

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

Negativo: quando il rapporto è  $< 0.8$ .

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

## **12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

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

## **13. SPECIFICITA' ANALITICA**

Sono stati testati 63 sieri contenenti potenziali interferenti quali:

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

In nessun caso si sono osservate interferenze.

## **14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA**

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

I sieri erano divisi in 5 pannelli diversi:

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

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

**15. PRECISIONE****Precisione nella prova**

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

**Precisione tra prove**

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

**Precisione fra lotti**

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

**16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO**

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi IFU punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante



		il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

## **17. BIBLIOGRAFIA**

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



## INSTRUCTIONS FOR USE

### ENZYWELL VARICELLA ZOSTER IgM

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

(English)

#### 1. INTENDED USE

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

#### 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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

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

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

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

#### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

#### 4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

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

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

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

**CONTROL +** POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

To be used to dilute samples.

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

**SUBS TMB** SUBSTRATE (PF93619) 1 x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

#### **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.**

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 nm or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µL solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

#### **5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS**

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

#### **Reagents have a limited stability after opening and/or preparation**

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control sera	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Reconstituted antigen	5 days at 2/8°C if reconstituted with conjugate; (-20°C if reconstituted with Wash Buffer. Avoid repeated freezing/thawing. See "Analytical Precautions" no. 1).
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	ready for use 2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

#### **6. PRECAUTIONS**

##### **FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.**

##### **Caution:**

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

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

#### Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
  - a) The Wash Buffer contains detergents
  - b) The conjugate contains phenol
  - c) The substrate is acid
  - d) The controls contain 0.9% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

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

#### Analytical precautions

1. **The antigen reconstituted with conjugate is not stable after freezing. In the case of a limited consumption of antigen, proceed as follows: Reconstitute the antigen in 1/10 of the volume reported on the label with Wash Buffer ready for use (eg. volume reported on the label 3 ml: reconstitute with 0.3 ml of Wash Buffer). Take the amount of antigen necessary for immediate use and mix with 10 parts of conjugate. Aliquot and freeze the remaining antigen. At the time of use, thaw and mix with 10 parts of conjugate.**
2. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
3. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
4. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
5. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
6. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
7. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
8. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
9. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
10. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO<sub>2</sub> incubators must not be used.
11. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
12. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
13. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.

14. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:

- installation and particular requisites
- operating principles, instructions, precautions and risks
- manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance

## **7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE**

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully shaken before performing the test. Heat inactivation does not lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

**The test cannot be performed on human plasma.**

## **8. TEST PROCEDURE**

### Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Prepare the antigen by reconstituting the freeze-dried product directly with the conjugate (volume shown on label). In the case of reduced consumption of the Ag, reconstitute with Wash Buffer ready for use (1/10 of the volume shown on the label) and then 1/11 in the conjugate.

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent; dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls 1 in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), add 100 µL of immunocomplex (antigen/labelled monoclonal antibodies) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

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

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

<b>9. SCHEME OF TEST PROCEDURE</b>
------------------------------------

### Manual Technique

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

—  
Incubate for 45 min. at 37°C

—  
Wash 4 times (30" soak time, 300 µL)

STEP 2 Add 100 µL of immunocomplex to each well

—  
Incubate for 45 min. at 37°C

—  
Wash 4 times (30" soak time, 300 µL)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

—  
Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

—  
Read absorbance at 450 nm within 30 min

**10. VALIDATION OF THE TEST**

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

**11. INTERPRETATION OF THE RESULTS**Qualitative results

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

Positive: when the ratio is  $> 1.2$

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

Negative: when the ratio is  $< 0.8$ .

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

**12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

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

**13. ANALYTICAL SPECIFICITY**

63 serum samples containing potentially interfering substances were tested:

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

No interference was observed in any case.

**14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY**

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

The samples were divided into 5 different panels:

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

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

**15. PRECISION****Precision "in run"**

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

**Precision “between runs”**

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

**Precision between batches**

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

**16. TROUBLE SHOOTING GUIDE**

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

**17. REFERENCES**

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



## INSTRUCCIONES DE USO

### ENZYWELL VARICELLA IgM

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

(Español)

#### **1. INDICACIONES**

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

#### **2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST**

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

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

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

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

#### **3. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

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

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

#### **4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO**

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

**Poner los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.**

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

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

**CONTROL +** CONTROL POSITIVO 1 x 1.6 mL

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

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

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

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

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

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

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

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



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

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

**Preparación:** Listo para su uso

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

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

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

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

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

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

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

Para la dilución de las muestras de suero.

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

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

**Contenido:** Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% estabilizados en tampón citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.

- Incubador a 37°
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidad hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) capaz de dispensar volúmenes en la gama 225-375 µL
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas y puntales de precisión para recoger 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.

## **5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS**

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

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

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
ANTÍGENO RECONSTITUIDO	5 días 2/8°C si reconstituido con conjugado; (-20°C si reconstituido con Wash Buffer. Evitar de congelar/deshelar repetidas veces (ver "precauciones analíticas" n. 1).
SUBSTRATO	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C, 1 semana a 15/30°C en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C
TAMPÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C,

## **6. PRECAUCIONES DE USO**

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

**Cuidado:**

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

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

#### Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
  - a) El tampón de lavado contiene detergentes
  - b) El conjugado contiene fenol
  - c) El sustrato es ácido
  - d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

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

#### Precauciones analíticas

1. **El antígeno reconstituido con el conjugado no es estable después de congelar. En caso de un consumo limitado del antígeno, proceder como sigue: Reconstituir el antígeno en 1/10 del volumen indicado en etiqueta con el Tampón de Lavado listo para su uso (ej. Volumen indicado en etiqueta es 3 ml: reconstituir con 0.3 ml de Tampón de Lavado). Retirar la cantidad necesaria de antígeno para uso inmediato y mezclar con 10 partes de conjugado. Dispensar y congelar el antígeno no utilizado. En el momento del uso, descongelar y mezclar con 10 partes de conjugado.**
2. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**
3. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
4. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
5. Lavar con ácido hidrocórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
6. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
7. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
8. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
9. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
10. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO<sub>2</sub>.
11. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
12. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
13. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
14. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:

- instalación y requisitos específicos
- principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
- especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
- mantenimiento y servicio técnico

## **7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN**

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

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

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

## **8. PROCEDIMIENTO**

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Wash Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Preparar el antígeno reconstituyendo el liófilo con el conjugado (volumen indicado en etiqueta), u, en caso de menor gasto del Ag, con Wash Buffer listo para su uso (1/10 del volumen indicado en etiqueta), y después 1/11 en el conjugado.

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira, (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo (antígenos/anticuerpos monoclonales etiquetados) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo. Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante. Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

<b>9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST</b>
--

- |        |  |
|--------|--|
| STEP 1 | Poner 100 µL de la muestra diluida/calibradores en los pocillos. |
|        | -  |
|        | Incubar 45 min. a 37°C   |
|        | -  |
|        | Lavar 4 veces (30'' tiempo de remojo, 300 µl)                    |
|        | -  |
| STEP 2 | Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo                   |
|        | -  |
|        | Incubar 45 min. a 37°C   |
|        | -  |
|        | Lavar 4 veces (30'' tiempo de remojo, 300 µl)                    |
|        | -  |
| STEP 3 | Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo                        |
|        | -  |
|        | Incubar 15 min. a T.A.   |
|        | -  |
| STEP 4 | Añadir 100 µL de Solución Bloqueante                             |
|        | -  |
|        | Leer la D.O.a 450 nm dentro de 30 min                            |

## **10. VALIDACIÓN DEL TEST**

Quitar el valor del blanco ( $\leq 0.150$ ) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El Control Positivo debe tener D.O. de por lo menos 1.5 veces el valor del Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser  $\leq 0.6$ . La D.O. del Cut-off debe ser  $\geq 0,2$  a 450 nm y  $\geq 0,16$  a 450/620 nm.

## **11. INTERPRETACIÓN DEL TEST**

### Resultados cualitativos

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

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

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es  $> 1.2$ .

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

No-inmune: si la concentración es  $< 0.8$ .

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

## **12. LIMITACIONES**

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

## **13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA**

Se analizaron 63 muestras de suero con potenciales interferentes como:

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

En ningún caso se observaron interferencias.

## **14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO**

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

Los sueros se dividieron en 5 paneles diferentes:

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

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

## **15. PRECISIÓN**

### **Precisión intra-ensayo**

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

**Precisión en ensayos**

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

**Precisión en lotes**

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

**16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS**

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

**17. REFERENCIAS**

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



## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### ENZYWELL VARICELLA IgM

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

(Português)

#### 1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

#### 2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

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

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

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

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

#### 3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

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

#### 4. CONTEÚDO DO KIT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**CONTROL +** CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

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

Cor: a cor dos soros de controlo é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLO DIRECTO 1 x 2.5 mL

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

Cor: a cor dos soros de controlo é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

**MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

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

**5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA**

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

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

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

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Soros de controlo	5 semanas a 2/8°C
Conjugado	5 semanas a 2/8°C
Antigénio reconstituído	5 dias a 2/8°C, se reconstituído com conjugado; (-20°C se reconstituído com Tampão de Lavagem. Evite congelar e descongelar repetidamente. Ver "Precauções técnicas" nº 1).
Substrato	até ao prazo de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
Diluyente de amostras	até ao prazo de validade a 2/8°C
Tampão de lavagem	pronto a usar, 2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.
Solução de paragem	até ao prazo de validade a 2/8°C.

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

Para uso diagnóstico in vitro.



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

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

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

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

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

## PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- **O antígeno reconstituído com conjugado não é estável após a congelação. No caso de um consumo limitado de antígeno, proceda da seguinte forma: Reconstitua o conjugado na proporção de 1/10 do volume indicado no rótulo do Tampão de Lavagem pronto a ser utilizado (ex: volume indicado no rótulo- 3 ml: reconstitua com 0,3 ml de Tampão de Lavagem). Obtenha a quantidade de antígeno necessária para uso imediato e misture com 10 partes de conjugado. Separe em alíquotas e congele o restante antígeno. No momento em que for utilizar, descongele e misture com 10 partes de conjugado.**
- Aguarde que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35°C nem sobe acima de 39°C.**
- Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
- Não utilize reagentes além do prazo de validade indicado. Deve evitar-se a contaminação microbiológica de reagentes, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
- Não modifique o procedimento de teste nem substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a menos que estejam indicados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
- Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidroclórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
- Evite a utilização de congeladores auto-descongeláveis para armazenamento de amostras.
- Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
- Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
- Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
- Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “sobre” as microplacas.
- Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num

incubador. Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO<sub>2</sub> não devem ser utilizados.

- Certifique-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa.
- A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
- O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
- Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o manual de instruções do fabricante para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
  - instalação e requisitos particulares
  - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
  - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
  - manutenção e reparação

## 7. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

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

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

**O teste não pode ser executado em plasma humano.**

## 8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Prepare a quantidade necessária de tiras.
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Prepare o antígeno reconstituindo o pó seco por congelação directamente com o conjugado (volume indicado na etiqueta). No caso de consumo reduzido de Ag, reconstitua com o Tampão de Lavagem pronto a usar (1/10 do volume indicado no rótulo) e, em seguida, com 1/11 no conjugado.

### PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

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

Cubra os poços com película protectora e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (300 µl, com 30 segundos de tempo de enxaguamento para cada ciclo), adicione 100 µL de imunocomplexo (anticorpos monoclonais do antígeno conjugados com HRP) em cada poço e volte a incubar durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com película protectora. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Por fim, distribua 100 µl do substrato em todos os poços (incluindo o primeiro para o branco).

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

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

## 9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

Deixe o primeiro poço (A1) vazio para o branco;

- A. Pipete 100 µL de controlos não diluídos nos poços designados.
- B. Pipete 100 µL de amostras diluídas nos poços subsequentes.
- C. Incube durante 45 minutos a 37°C
- D. Lave quatro vezes. (30'' de tempo de enxaguamento; 300 µL)
- E. Adicione 100 µL de imunocomplexo em cada poço (à excepção do poço A1)
- F. Incube durante 45 minutos a 37°C
- G. Lave quatro vezes. (30'' de tempo de enxaguamento; 300 µL)
- H. Adicione 100 µL de substrato a cada poço (incluindo o poço A1)
- I. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente
- J. Adicione 100 µl de solução de paragem (incluindo o poço A1)
- K. Leia a absorvência a 450 nm dentro de 30 min.

## 10. VALIDADE DO ENSAIO

O valor do branco deve ser  $\leq 0.150$ . Subtraia este valor de todas as outras leituras. O valor D.O. do Controlo Directo, quando testado em triplicado, deve estar dentro de 25% do valor médio. Elimine quaisquer valores anómalos e volte a calcular a média. O controlo positivo deve ter uma D.O., pelo menos, 1.5 vezes a do valor Directo. A relação entre Controlo Negativo e Controlo Directo deve ser  $\leq 0.6$ . A D.O. do Directo deve ser  $\geq 0.2$  a 450 nm e  $\geq 0.16$  a 450/620 nm.

## 11. CÁLCULO QUALITATIVO

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

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

A amostra é considerada:

Positiva: quando a relação  $\geq 1.2$

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

Negativa: quando a relação  $\leq 0.8$ .

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

## 12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

## 13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 63 amostras de soro contendo substâncias potencialmente interferentes :

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

Nenhuma interferência foi notada em qualquer caso.

## 14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE RELATIVA

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

As amostras foram divididas em 5 painéis diferentes.

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

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

## 15. PRECISÃO

### Intra-ensaio

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

### Entre ensaios

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

### Entre lotes

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

## 16. SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS












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

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no folheto da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dessecante de sílica gel deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova alíquota de substrato.
	Lavagem inadequada	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano

		suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções de utilização recomendadas.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

## 17. BIBLIOGRAFIA

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

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante 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



**Diesse Diagnostica Senese**  
**Via delle Rose 10**  
**53035 Monteriggioni, Italy**  
**Tel. 0577-587111**